



TITLE:

十字花科作物の交雑不和合性に関する
発育遺伝学的研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

猪俣, 伸道

CITATION:

猪俣, 伸道. 十字花科作物の交雑不和合性に関する発育遺伝学的研究. 京都大学, 1973, 農学博士

ISSUE DATE:

1973-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k1294>

RIGHT:

十字花科作物の交雑不適合性に
関する雑育遺伝学的研究

猪俣伸道

— 1972 —

1

十字花科作物の交雑不適合性に関 する生育遺伝学的研究

目 次

I	緒 言	----- 4
II	実験材料	----- 21
III	実験方法および結果	----- 27
A.	2倍体 <u>Brassica campestris</u> L. ssp. <u>chinensis</u> (L.) Makino と同属4倍体 <u>Brassica campestris</u> L. ssp. <u>pekinensis</u> (Lour.) Olsson の交雑不 適合性に関する研究	
(1)	胚発生学的研究	----- 27
(i)	自然条件における胚発生	----- 28
(ii)	胚珠の人工培養に伴う胚 発生	----- 48
(iii)	子房の人工培養に伴う胚 発生	----- 58
(2)	器官の人工培養による雑種植物	

の育成	-----	100
(i) 自然状態による交雑結果	-----	100
(ii) 胚培養	-----	106
(iii) 胚珠の人工培養	----	114
(iv) 子房の人工培養	----	121
(v) 子房の人工培養による新 型プラスの育成	----	181
(3) 交雑不適合性の生理学的研究	-----	226
(i) 子房の培養条件の検討	-----	227
(ii) 2倍体 <u>Brassica campestris</u> L. ssp. <u>chinensis</u> (L.) Makino と 同質4倍体 <u>Brassica</u> <u>campestris</u> L. ssp. <u>pekinensis</u> (Lour.) Olsson の間の交雑不 適合性における遊離アミ ノ酸の消長	-----	248
(4) 考察および論議	-----	259

- (i) 胚発生学的研究-----259
 (ii) 器室の人工培養による雑
 種植物の育成 ----- 274
 (iii) 交雑不適合性の生理学的
 研究 -----300

B. Raphanus sativus L. の2倍体とその同質4
 倍体の交雑不適合性に関する研究
 -----309

- (1) 胚発生学的研究 -----309
 (2) 子房の人工培養 -----327
 (3) 考察および論議 -----335

IV 摘 要	-----341
謝 辞	-----350
引用文献	-----351 ⁹
英文摘要	-----362

I 緒 言

重複受精は被子植物特有の受精様式である。胚嚢に花粉管が到達すると、2個の精核がそれぞれ卵核および極核と合体する現象で、卵核と精核の合体を生殖受精、極核ともう1つの精核との合体を栄養受精といい、両者を合わせて重複受精と呼んでいる。被子植物においては、この重複受精の過程において、他の生物にみられない特有の現象が起こってくる。その1つに不稔の現象がみられる。

高等植物における不稔の現象は(1)花粉が雌蕊の柱頭の上で全く発芽しない場合、(2)発芽はするが花粉管が花柱の中をある程度までしか伸びずに止ってしまう場合、(3)花粉の発芽と花粉管の伸長は正常にみられるが、精核が胚嚢に入れないで受精が行なわれない場合、(4)受精は行なわれるが、胚珠の発達途中で止まってしまう場合、(5)種子は形成されるが、それが発芽しない場合、等に大きく分けて考えることが出来る。これら

の不稔現象は「いずれの場合でも植物体間の遺伝的又は生理的作用の支配を受けてゐることが多い。

不稔現象を大まかく5つに分けたなかで、特に重複受精と密接な関係にあるものは、(4)の受精は行なわれるが、胚珠の発達が途中で止まつてしまう場合である。というのは受精後胚や胚乳の初期の発達は正常にみられるが、胚と胚乳との遺伝的な不均衡のために、やがて胚嚢の崩壊が起るのが認められるからである。この現象は種属間交雑、倍數性の異なる間の交雑の両方又は1方の組合せにおいて頻繁にみられるものである。

種属間交雑では、胚・胚乳・胚珠の組織との間の関係は異質のものの結合であるが、2倍体個体ととの同質4倍体個体との間の正逆交雑を行つたとき、胚・胚乳・胚珠の組織との間には、同一ゲノムの倍數性の関係が生じてくる(表1)。2x x 2x 或いは 4x x 4x の交配では、胚・胚乳と胚珠の間のゲノムには2:

3 : 2 の比例関係が成り立つ。このような関係が成立する倍數体間の交配であつても稔性のある種子が形成される。— オ $2x \times 4x$ では胚・胚乳・胚珠のゲノム構成の比例関係は 3 : 4 : 2 となり、 $4x \times 2x$ では 3 : 5 : 4 となる。このように胚・胚乳・胚珠のゲノム構成の比が 2 : 3 : 2 からずれてくると、種子形成は異常をもたせてくるのである。

更にこの関係を吟味してみると、 $2x \times 4x$ の胚では 1 ゲノムを母オから、2 ゲノムを父オから受け取つて 3 倍体を形成する。— オ $4x \times 2x$ では 2 ゲノムを母オから、1 ゲノムを父オからもらつて 3 倍体を形成する。両者共に同一ゲノムをもつ 2 倍体と同質 4 倍体との交雑であれば、どちらを母オにしても得られる 3 倍体雜種の胚は遺伝的に内容の同じ 3 倍体になる。ところが胚乳の形成を考えると、 $2x \times 4x$ では 2 ゲノムを母オから、2 ゲノムを父オから受けることになるが、 $4x \times 2x$ では 4 ゲノムを母オから、1 ゲノムを父オからもら

Table 1. Genome relationships among embryo, endosperm and ovule in reciprocal crosses between $2x$ and $4x$

Cross	No. of genomes in embryo		Total no. of genomes in embryo	No. of genomes in endosperm		Total no. of genomes in endosperm	No. of genomes in ovule
	From female	From male		From female	From male		
$2x \times 2x$	1	1	2	2	1	3	2
$2x \times 4x$	1	2	3	2	2	4	2
$4x \times 4x$	2	2	4	4	2	6	4
$4x \times 2x$	2	1	3	4	1	5	4

うニとになつてくる。このように胚乳の関係はどちらを母オにしたかでゲノム構成が異なつてくるので、交雑して種子形成がうまくいかなかったのは、胚自体の問題のほか、このような胚乳のより複雑な関係に起因してゐる場合が多い。特に同価倍数体同士の正逆交雑において一オの親と母オにしたときに稔性のあつた種子が得られるが、他オと母オにしたときには不稔になるという場合には、明らかに上述しゝ如く胚乳にその原因があると考へてよいであらう。

ニニでは受精と初期の胚発生は正常に起るが、以後稔性の異常を引き起して不稔種子を形成する現象を交雑不適合性と定義して種子の角度から論究してみたい。

ニニで述べる交雑不適合性の研究を行う材料は Brassica 属の数種類と Raphanus 属の4種類である。

アブラナ属 (Brassica) に属する作物は、日本人の食生活には欠かせない重要なもので、

Table 2. Relationship among several species of genus Brassica as to their chromosome number and genome constitution

Species	Chromosome number ($2n$)	Genome formula ($2n$)	Reference
<u>B. campestris</u> L.	20	aa	Karpechenko, 1922
<u>B. nigra</u> Koch	16	bb	Karpechenko, 1922
<u>B. oleracea</u> L.	18	cc	Karpechenko, 1922
<u>B. juncea</u> Coss.	36	aabb	Shimotomai, 1925
<u>B. napus</u> L.	38	aacc	Morinaga and Fukushima, 1930 Nagai and Sasaoka, 1930
<u>B. carinata</u> Braun	34	bbcc	Morinaga and Fukushima, 1930 Nagai and Sasaoka, 1930

表2に示されるように6群に大別することから来る(細田1961)(表2)。これによつて明らかになるように、B. juncea は B. nigra と B. campestris との異質倍数体であり、B. napus は B. oleracea と B. campestris との異質倍数体であり、また B. carinata は B. nigra と B. oleracea との異質倍数体である。B. oleracea 群の形態的多様性は著しく、多数の栽培品種に分化している。おもな栽培種と摘記してみると、次のようである。

B. oleracea L. var. acephala DC. 繖葉甘藍,
羽衣甘藍

” ” botrys L. 花椰菜

” ” bullata DC. 縮綃甘藍

” ” capitata L. (結球)甘藍

” ” gongylodes L. 球莖甘藍

” ” gemmifera Zenker 子持甘藍

(細田 1961)

また B. campestris 群の種においても、これまた多数の栽培品種があり、次のように分類されている。

B. campestris L. 油料作物のアブラナ

B. rapa L. 食用または飼料用根菜のカ
ブ

B. pekinensis Rupr. 葉菜のハクサイ

B. chinensis L. タイナの類

B. nipposinica Bailey ミズナ

B. narinosa Bailey ヒサゴナ

しかしながら、これらを種として独立させるよりは亜種または変種として一括しなおが好ましいということから、最近 Olsson (1954) は B. campestris 群を次のように分類した。

B. campestris L. ssp. eu-campestris (L.) Olsson

野生種

" " oleifera (Metzg) Sinsk.

アブラナ

" " rapifera (Metzg) Sinsk.

カブ

" " chinensis (L.) Makino

タイナ

" " pekinensis (Lour.) Olsson

ハフサイ

B. campestris L. ssp. narinosa (Bailey) Olsson

ヒサゴナ

" " nipposinica (Bailey) Olsson

ミズナ

" " dichotoma (Boxb.) Olsson Toria

" " trilocularis (Boxb.) Olsson Sarson

このうち, ssp. eu-campestris (野生種), ssp. dichotoma (Toria) および ssp. trilocularis (Sarson) の 3 亜種は, 本邦にはほとんどみられなく (細田 1961)。

Brassica 属の場合は大きく 3 つの項目について研究を行なった。即ち (1) 胚発生学的研究, (2) 器官の人工培養による雑種植物の育成, (3) 交雑不適合性の生理学的研究, である。一方 Raphanus 属においては, 胚発生学的研究と子房の人工培養, との 2 項目について研究を行なった。

高等植物における交雑不適合性の現象は種間交雑や倍数性の異なる植物の間での交雑で

は良くみられることである。種間交雑や正逆交雑の一方或は両方においてみられる不稔の現象は、Galeopsis (Müntzing 1930, 1933), Avena (Kihara and Nishiyama 1932), Triticum (Watkins 1932, Wakakuwa 1934, Boyes and Thompson 1937), Medicago (Brink and Cooper 1939, Ledingham 1940), Nicotiana (Cooper and Brink 1940), Hordeum x Secale (Brink et al. 1944, Cooper and Brink 1944), Datura (Satina et al. 1950), Solanum (Beamish 1955, Lee and Cooper 1953), Amaracea (Stokes 1955), Gossypium (Weaver 1957, 1958), Aegilops and Triticum (Nishikawa 1959), Primula (Woodel 1960a, b), Melilotus (Jaranowski 1962a), Lupinus (Jaranowski 1962b, c), Lotus (Jaranowski and Wojciechowska 1963), Brassica (Moue and Murakami 1965), 等に見られ、2倍体と同様4倍体との正逆交雑では、Brassica (Howard 1939), Datura (Sansome et al. 1942), Lycopersicon (Cooper and Brink 1945), Secale (Håkansson and Ellerström 1950), Zea mays (Cooper 1951), Raphanus (Nishiyama 1952a), Brassica (Nishiyama and Inamori 1952, 1953), Hordeum (Håkansson 1953), 等において観察されている。

胚発生学的な立場からは、Brassica campestris 科の倍數性の異なる個体間の正交交雑における、交雑不適合の胚発生の組織学的な研究がなされた。この研究は高等植物の重複受精の立場から重要であると思われた。また胚珠または子房の人工培養による途中の発達段階における胚発生の研究も重要であると考え、これ等の研究を行なった。

器官の人工培養による雜種植物の育成については、大きく3つに別けた。(1)胚培養 (2)胚珠の人工培養、(3)子房の人工培養である。

胚培養は2つの面において重要である。その1つは育種の面において、有用な雜種を作成してゆく方法として重要性があり、他方は胚の形態形成の過程において、種々の養分に対する要求またはその作用を生理学的に明らかにするための実験方法としての重要性である。

Datura stramonium の成熟した胚は生長素の面からは完全に独立で、無機物と砂糖を含む単純

な培地で十分に生育するが、発達初期の胚を
 胚珠から取り出して培養する場合には生養素
 が要求される。生長素としてはココナットミ
 ルクが非常に有効であるが、その成分は主と
 して3つに分けることが出来る。1つは"embryo
 factor"として細胞分裂を起こさせるものであ
 り、2つは根の生長を阻害するに十分な量か
 存在するオーキシンであり、3つのは
 "leaf growth factor"として子葉の生育を助長す
 るものである。これ等一連の研究は Van Overbeek
 およびその共同研究者 (Van Overbeek et al. 1941,
 1942, Van Overbeek 1942) によつてなされた。その
 後幼胚の成育に有効な物質の研究は数多くの
 研究者によつて多種類の植物に及びてなされ
 てきている。例之は Datura (Sanders and Burkholder
 1948, Solomon 1950, Rietsema et al. 1953, Matsubara
 1962), Cattleya (Spoerl 1948), Hordeum (Ziebur and
 Brink 1951, Norstog 1961), Cucumis と Cucurbita (Nakajim
 1962), 等に於てみられるのである。またこれ
 等一連の研究による "embryo factor" の発見によ

リ、胚珠から取り出した胚の人工培養が可能になつてくると、有用な植物体を育成する研究にも取り入れられてきた。Laibach (1925, 1929) によれば、Linum perenne x L. austriacum では果実は正常に发育するが、種子は萎縮してしまい、その胚は正常に発達して種子の約 $\frac{1}{2}$ しかなく、しかしながらその胚を取り出して湿度のある濾紙上に置けば、発芽して植物体をつくる。その正逆交雑の L. austriacum x L. perenne では正常種子の約 $\frac{1}{3}$ の胚しかなく、胚を取り出して発芽することはなく、ところが交配後2週間頃に胚を切り出して10~15%の砂糖水を含む綿の上に置けば生長を続け、やがて植物体にまで生育する。Hordeum jubatum x Secale cereale の間の交配においては、受精は交配後4時間後に起こるが、雑種胚は生育せずに崩壊する。しかしながら交配後9-12日目の胚を取り出して人工培地上に置床すれば、发育して植物体を形成する (Brink et al. 1944)。これらのことから、胚発生が途中で止まって

しまいのは遺伝的な要因による。また生理的な異常が原因になつてゐることが明らかになつた。これ等の研究に基づいて、新しい雑種個体を育成する研究が多くなされてきた。例えば Prunus と Lilium (Skirm 1942), Datura (Blakeslee and Satina 1944, McLean 1945, 1946, Sanders 1948, 1950, Sachat 1948), Lycopersicon esculentum と L. peruvianum (Smith 1944), Hordeum (Konzak et al. 1951), Chrysanthemum (Kaneko 1957), Oryza (Nakajima and Morishima 1958), Brassica (Nishi et al. 1959), 等である。

胚珠或は子房の人工培養は、胚培養或は植物の組織培養の研究の発展に伴つて、Nitsch (1951) が Lycopersicon と Cucumis の子房の人工培養を試み、生育可能な種子を得てから、胚珠或は子房の人工培養が Maheshwari (1958) や Maheshwari and Lal (1961) によつて受け継がれ、この種の研究が活発になつてきた。そして胚珠或は子房の人工培養は、生殖生理学の立場と胚培養の困難なものからの雑種個体を育成する場合に有効であると思われる。今まで行なわれた胚

珠或は子房の場合は、ほとんどが生理学的な
 胚芽で、用いられる主な基本培地は Lycopersicon,
Cucumis (Nitsch 1951), Papaver (Maheshwari 1958), Citrus
 (Ranja Swamy 1959), Zephyranthes (Sachar and Kapoor 1959),
Gynandropsis と Impatiens (Chopra and Sabaharwal 1963),

Allium (Guha and Jori 1966), Petunia (Shivanna 1965, 中尾 1969),
Trifolium (Nakajima et al. 1969) 等の培養では

III Nitsch (1951) であり, Hordeum (LaCroi et al. 1962),
Anethum (Jori and Sehgal 1963), Allium (Guha and Jori 1966)
Citrus (Sabaharwal 1963), 等は White (1963), Allium
 (Guha and Jori 1966) では Heller (1953), Nicotiana (Dulieu
 1966) では Murashige and Skoog (1962) であつた。

I 胚培養は胚発生の立場から異常生育をして
 胚乳や内珠皮の組織を除いて培養すること
 であるが、胚珠或は子房の培養は胚珠全体を培
 養することであるから、交雑不融合の現象と
 考え合わせると、異常が起こってくる胚乳や
 内珠皮の組織を、正常に生育させて生育可能
 な種子或いは植物体をつくらうとする試みで
 ある。受精した極く初期の胚は、胚培養によ

って雑種個体を作ることは困難である。Datura stramonium x D. mentel においては、受精卵は2回或は3回の分裂後は退化してしまふ (Satina and Blekeslee 1935), また D. prunosa x D. mentel では接合体は分裂せず、胚乳が数回分裂するだけであり、D. menteloides x D. discolor と D. ceratocaulis x D. menteloides の組合では、胚珠は受精し、胚も胚乳も1回目の分裂は正常に行なわれる。胚が球形になったときに胚乳は崩壊を始め、胚嚢細胞の異常増殖があるため、生育可能な種子と得ることは出来な (Sachet 1948)。これらのものには胚珠或は子房の人工培養を試みることによって、雑種個体を作り出す可能性がある。

胚珠或は子房の人工培養の生理学的な立場の研究は、胚の或る発達段階のものも培養し得るものが多い。用いた培地の検討も糖濃度、光の条件等についてこの研究も余りみられていない。それ等の研究を行うことは、今後の胚珠或は子房の人工培養を進展させるためには

必要なことであろう。

不稔現象に関する研究は花粉が柱頭上で発芽、花柱への侵入、伸長の阻害の面の研究、或は不適合遺伝子型による不稔現象の研究等が多い。ここで述べる受精後の胚発生の異常についてこの組織学的研究や交配組合せについてこの研究は多くの報告がある (Brink and Cooper 1947, Nishiyama and Inomata 1966)。しかしながらこの交雑不適合性に関する生理学的研究は余りなされていない。Datura の交雑不適合性について、その崩壊した種子の抽出液を正常に発達している同じ Datura の朔の4つのうちの1つに注入すると、注入された部位の朔の種子が不稔になり、この物質は核酸類似物質であると報告された (Rappaport et al. 1950)。それ以外に蛋白質、アミノ酸等は糖類についてこの研究はほとんど見当たらない。種子形成と遊離アミノ酸の研究は Zea mays の胚乳の発達過程で、時間的变化を追った研究があり (Duvick 1952)、雄性不稔と起こす花粉の遊離アミノ酸の消長が調

へられてゐる程度である (Fukasawa 1954)。交雑不
和合に関する研究のうち、その交雑不和合を
克服する研究と合わせて、組織学的な研究と
結び付いたどのような物質の変化が胚珠内に
起こつてゐるかと研究することは大切である
と考えた。

II 実験材料

本研究に用いた材料は Brassica 属の数種と
Raphanus sativus 4 種類である。Brassica 属と
Raphanus の同属 4 倍体は 1951 年西山がコルヒチ
ン処理で作つた以来、京都大学農学部遺
伝学研究室で系統保存してきたもの、東北教育
大学農学部植物育種学研究室で作つて保存して
きたもの、岐阜農業試験場で保存してきたも
のである。それ等を表 3 にまとめ示す(表
3)。それと同時に本実験に供試した品種名、
染色体数、ゲノム構成、および供試種子の由
来も記した。

Table 3. Materials used in the experiment

Species	Horticultural variety	No. of chromosomes ($2n$)	Genome formula ($2n$)	Origin
<u>Brassica campestris</u> L.	Nikanme-taina Seppaku-taina "	20 20 40	aa aa aaaa	1 1 2
	Nozaki-hakusai No. 2	20	aa	1
	Chifu-hakusai	20	aa	1
	Kyoto-hakusai	20	aa	1
	Chifu-hakusai	40	aaaa	2
	Nozaki-hakusai	40	aaaa	3
	Kanamachi-kokabu	20	aa	1
	Wase-komatsuna	20	aa	1
	Hatana	20	aa	1
<u>Brassica oleracea</u> L.	Nozaki-wase	18	cc	1
	Nozaki-chusei	18	cc	1
	Succession	18	cc	1
	Nakano-wase	18	cc	1
<u>Raphanus sativus</u> L.	Mino-wase	18	RR	4
	Mino-yon	36	RRRR	4
	Shogoin	18	RR	2
	"	36	RRRR	2

- 1: Takii Seed Co.
 2: Lab. of Genet. Kyoto Univ.
 3: Lab. of Plant Breed. Tokyo Univ. of Education
 4: Exp. Stat. of Agric. Gifu Pref.

表3からも明らかなるように2倍体の B. campestris ssp. chinensis と2倍体 B. campestris ssp. pekinensis, B. campestris ssp. rapifera, B. campestris ssp. oleifera は同じゲノム式 aa を持つてゐることば Morinaga (1934) によつて報告されてゐる。なお Brassica 属には表2に記したように B. oleracea (cc) と B. nigra (bb) を基本のゲノム型として, B. juncea Hemsl. ($2n=36$, $aabb$), B. carinata Braun ($2n=34$, $bbcc$) と B. napus L. ($2n=38$, $aacc$) 等の複二倍体が成立した。これ等は人間にとつて非常に利用価値の高いものばかりである。

B. campestris ssp. chinensis, ssp. pekinensis, ssp. rapifera, ssp. oleifera は同じゲノム式 aa を持つが、これ等の形態的な差異は明瞭でこれらの間に合成される雑種の識別は容易である。ここでは2倍体 B. campestris ssp. chinensis と同復4倍体 B. campestris ssp. pekinensis の交雑において、胚・胚乳の発生学的な研究を行つたが、これに先立って同じゲノム構成を持つ B. campestris ssp. chinensis と B. campestris ssp. pekinensis との間

での $2x \times 2x$ 交配は $4x \times 4x$ の交雑率を調査した。
その結果を表4に示す(表4)。

表4に示した通り、2倍体同士或は4倍体
同士の交雑であれば、同じゲノム式 aa を持つ
ものの間では高い種子稔性と発芽率がみられ
ることが分かった。 $4x \times 4x$ の組合では種子稔
性は余り高くなかったが、これは雪白体菜の
4倍体の生育が悪く、花粉の発達も余り良くな
りためであると思われたが、得に種子の発芽
率は $2x \times 2x$ の場合と同様に高かった。

実験にあたっては、その材料である B.
oleracea 群を8月中旬に木箱に播種し、10月初
めに第一回目の移植を、翌年1月に2回目の
移植を行ない、屋外に置き、3月終りからガ
ラス室内に入れ実験に使用した。またその他
の Brassica 類と Raphanus 類とは10月末から11月初
めに木箱に播種し、ガラス室内で発芽させ、
翌年1月の中に第一回目の移植を植木鉢に行
ない、2月中旬から末にかけて2回目の移植と
行ない、屋外に3月終りまで置き、3月末か

Table 4. Results of crossing experiments of 2x and 4x in Brassica campestris L.

Cross	Ploidy	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
Nikanme-taina x Nozaki-hakusai No. 2	2x 2x	10	56.5	196	86.3	79.6
Nozaki-hakusai No. 2 x Nikanme-taina	2x 2x	7	59.9	142	85.5	97.9
Seppaku-taina x Nozaki-hakusai	4x 4x	23	48.4	56	15.8	96.8
Nozaki-hakusai x Seppaku-taina	4x 4x	20	50.3	107	19.3	100

らガウス室内に移して、臭駿に供した。

交雑の方法は、開花2日前と思われる蕾を
除雄し、硫酸紙の袋で覆い、2日後に開花し
た花の花物を午前の9時から11時の間に授粉
に供した。Brassica類では大体1花序当り10花
を除雄し、当日咲いた花を5花から8花用い、
他は取り除いた。Raphanus類では1日に咲く花
の数が少なく5花から6花を除雄し、当日咲
いた平均的な花を用いた。交雑後4日から6日
まではこれらの花序を硫酸紙の袋で包み、他
の花との自由な受粉を避けるように注意した。

新型ナプスの育成と子房の培養条件の検討
以外の臭駿属のBrassica属の場合の交雑は

B. campestris ssp. chinensis ($2n=20$) と B. campestris ssp.

pekinensis ($2n=40$) について次のように行なった。

ssp. chinensis ($2n=20$) x ssp. chinensis ($2n=20$)

ssp. chinensis ($2n=20$) x ssp. pekinensis ($2n=40$)

ssp. pekinensis ($2n=40$) x ssp. pekinensis ($2n=40$)

ssp. pekinensis ($2n=40$) x ssp. chinensis ($2n=20$)

なお Raphanus 属の交雑は次のように行なった。

R. sativus ($2n=18$) x R. sativus ($2n=18$)

R. sativus ($2n=18$) x R. sativus ($2n=36$)

R. sativus ($2n=36$) x R. sativus ($2n=36$)

R. sativus ($2n=36$) x R. sativus ($2n=18$)

なお植物個体の倍数性の確認は酢酸カーミンの押潰し法で花粉母細胞の中期の染色体を観察して行なった。またハクサイとキャベツの交雑より得た植物体の染色体数の調査は、植物体の根端で行なった。根端は氷水 (0°C) で24時間前処理後、アセティックアルコール (氷酢酸1:95%エタールアルコール3) で固定し、フォイルゲン反応で、染色体数を確認した。

III 実験方法および結果

A. 2倍体 Brassica campestris L. ssp. chinensis

(L.) Makino と同質4倍体 B. campestris L. ssp.

pekinensis (Lour.) Olsson の交雑不適合性に関する研究

(1) 胚発生学的研究

(i) 自然条件下における胚発生

Raphanus sativus (Nishiyama 1952a, b) では $2x(\sigma) \times 4x(\sigma)$ の交雑において交雑種子が得られたが, $4x(\sigma) \times 2x(\sigma)$ では小さい交雑種子が得られている。また Brassica 属で同じゲノム構成を有する B. pekinensis, B. chinensis と B. campestris (= B. rapa) では2倍種とそれ等の同質4倍種の交雑で発芽する種子はほとんど得られなかった (Nishiyama and Inamori 1953)。Håkansson (1956) は B. oleracea と B. campestris (= B. rapa) の2倍体と同質4倍体との正逆交雑を試みた結果, 通常これらの正逆交雑において, 正常な胚珠の形成がなれないために発芽する種子は得られなかった。また B. oleracea と B. campestris との間の種間交雑において胚の発達はみられるが, 胚・胚乳の退化が発達初期に起こって, 正常な発芽種子は得られなかった。

ここにおいては, 自然条件下における2倍体 B. campestris L. ssp. chinensis (L.) Makino と同質4倍体の B. campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Olsson

との正逆交雑における胚発生の異常に伴う崩壊と発生学並びに組織学的に觀察した。

材料および方法

2倍体=食目倍葉と同種4倍体 \times 一 \rightarrow 白菜を用いて、 $2x \times 2x$ 、 $2x \times 4x$ 、 $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交配を降雄後2日目にはガラス室内で行なつた。

子房は交配後1日、3日、6日、9日、12日、15日、18日と21日目にそれぞれカルノワ液で約10分間固定し、フブツマブアニ氏液で24時間再固定を行なつた。なおブアニ氏液で固定するときには減圧し、固定液が組織の内部によく浸透するように注意した。固定した材料はブタノールシリーズを用いてパラフィンに埋藏し、11~15ミクロンの厚さでパラフィン切片を造り、ハイデンハイニ鉄ミヨハニイマトキシリン染色法によつて染色した。組織中の澱粉粒の觀察にはヨード飽和の抱水クロール液を用いた。

組織切片の観察には顕微鏡を用い、スケッチにはカメラ・ルネダを使用した。

得られた雑種個体については、形態的な観察と併せて染色体数を調査した。

結 果

2x と 4x の正逆交雑とそのF₁雑種

各交雑の結実率（得られた種子数 / 全胚座数 × 100）を成熟した莢で調べた（表5）。

Table 5. Results of crossing experiments

Cross	Year	No. of flowers pollinated	No. of capsules examined	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Av. capsule length (mm)
2x x 2x	1961	58	57	169	19.8	25.3
	1962	124	89	161	10.1	31.2
2x x 4x	1961	72	72	2*	0.14	34.7
	1962	53	47	0	0.0	41.3
4x x 4x	1961	33	33	275	35.3	57.0
	1962	117	80	591	29.2	41.2
4x x 2x	1961	85	84	27**	1.7	55.0
	1962	122	114	11***	0.4	52.3

* Both seeds were diploid.

** Out of 27 seeds 24 germinated and gave rise to triploid hybrids.

*** All 11 seeds were triploid.

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の個体の着粒率はかなり低かったが、これは他殖性作物が系統保存のため自殖せしめるのによる有害な効果と思われる。

$2x \times 4x$ の交雑において、多くの胚珠は多少発達の特徴を示しているが、胚珠の発達の初期に崩壊してしまっている。 $4x \times 2x$ においてもほとんど胚珠の発達の早い時期に崩壊してしまっているが、僅かなからる倍性の交雑種子が得られている。

$2x \times 4x$ の交雑において、2粒の良き種子が得られ発芽したが、これら二つは植物は形態的に全く母親の性質のみを示し、また花糸の細胞においても $2n=20$ を示している。自殖によるものと考えられる。 $4x \times 2x$ から得られる倍体の F_1 個体を形態的に観察すると、葉の先端は白菜 ($2x$)、葉の厚さと種子の大きさは白菜 ($4x$) 型、着蕾状態は中間型であった (表6, 7)。

交雑種子の胚発生

胚珠の種々の段階で各交配組合せの組織学

TABLE 5. MORPHOLOGY OF THE 16 TETRAPLOID AND DIPLOID PARENTS

Plant No.	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Shape of inflorescence			Seed size		Ploidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Compact	Intermediate	Lax	Large	Small	
4	*	*	*	*	*		*	*	*	4x 2x
2										
1		*	*			*		*		3x
2		*	*			*		*		3x
3		*	*			*		*		3x
3		*	*			*		*		3x
3		*	*			*		*		3x
4		*	*			*		*		3x
5		*	*			*		*		3x
6		*	*			*		*		3x
7		*	*			*		*		3x
8		*	*			*		*		3x
9		*	*			*		*		3x
10		*	*			*		*		3x
11		*	*			*		*		3x
12		*	*			*		*		3x
13		*	*			*		*		3x
14		*	*			*		*		3x
15		*	*			*		*		3x
16		*	*			*		*		3x
17		*	*			*		*		3x
18		*	*			*		*		3x
19		*	*			*		*		3x
20		*	*			*		*		3x
21	*	*	*			*		*		3x
22	*	*	*			*		*		3x
23	*	*	*			*		*		3x
24	*	*	*			*		*		3x

-: undetermined. 4: tetraploid parent, 2: diploid parent.

Table 7. Morphology of $4x \times 2x$ hybrid plants (1963)

Plant No.	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Shape of inflorescence		Seed size		Ploidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Compact	Interme- diate	Large	Small	
4	*	*	*	*	*	*	*	*	$4x$
2									$2x$
3-1	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-2	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-3	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-4	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-5	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-6	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-7	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-8	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-9	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-10	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$
3-11	*	*	*	*	*	*	*	*	$3x$

2: diploid parent, 4: tetraploid parent.

的な観察を行なった。図1には受精した胚珠が正常に発達して、交配後9日目に至ったものの縦断面をスケッチによつて示した(図1)。

I. $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$: 交配後1日目では $2x \times 2x$ においては9個の子房を観察したが、受精したと思われる胚珠はなく、 $4x \times 4x$ では10個の子房のうち僅かに2個の胚珠の受精が認められた。3日目の胚珠では、幼胚は1から2細胞で、その時の胚乳核の数は $2x \times 2x$ では12から100、 $4x \times 4x$ では20から200であった。 $2x \times 2x$ の胚乳には小さな澱粉粒が数らかみられたが、 $4x \times 4x$ では、大きく丸いのをばっきりと観察した。

6日目には、幼胚の細胞数はいずれも2から8細胞で、胚乳核の数は $2x \times 2x$ で約90から800、 $4x \times 4x$ では100から600であった。胚の周囲の胚乳はかなり密な状態を示した(図4a)。 $2x \times 2x$ よりも $4x \times 4x$ の方に澱粉粒が多く観察された。

9日目では、胚珠の大きさが大きくなり、

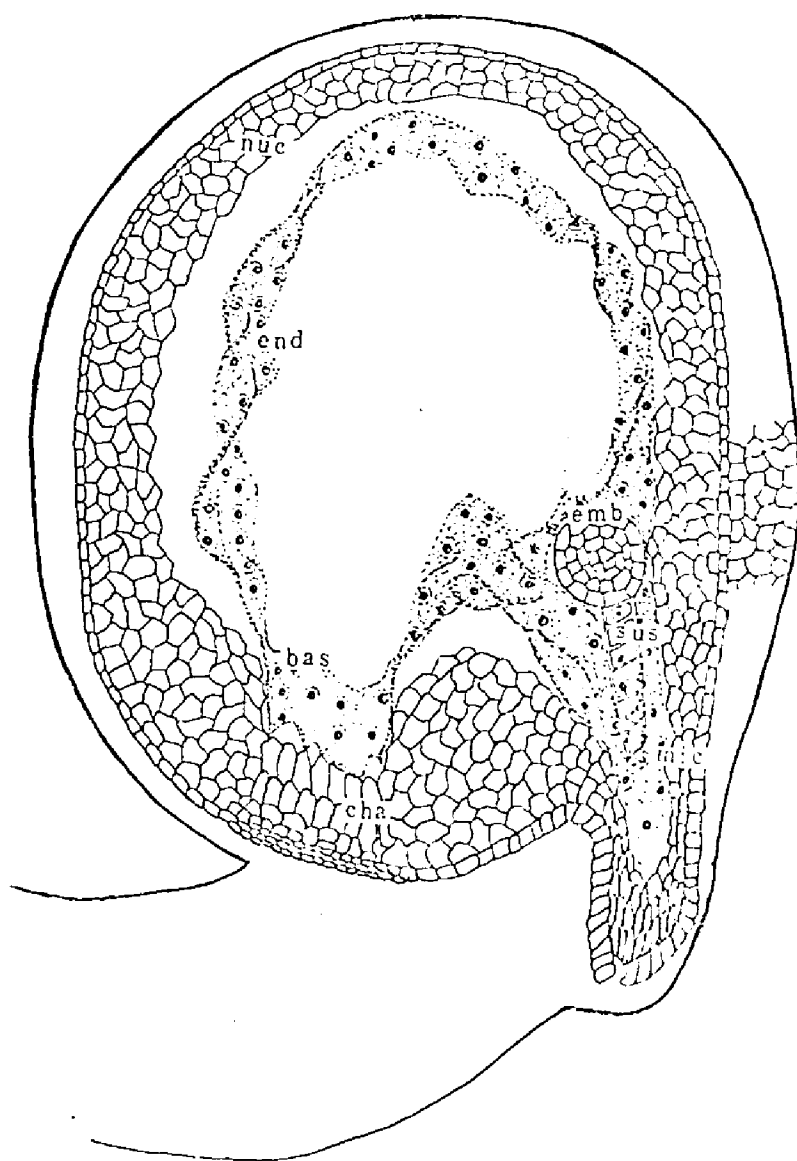


Fig. 1. The transverse section of the whole part of a fertilized ovule. bas: basal endosperm, cha: charazal part, emb: embryo, end: endosperm, mic: micropylar part, nuc: nucellus cells, sus: suspensor.

胚は球型を示した。これ以後の胚の発達 は $2x \times 2x$ よりも $4x \times 4x$ の方が早くなることがみられた。胚乳細胞も増加して、胚の回りは相當に密な状態を示したが、また膜形成は認められなかった (図4b)。

12日目になると、胚は球型から "heart" 型に変形し、胚乳の膜形成も胚付近から始まってくるのがみられた (図4c)。しかし "basal endosperm" はなおも発達を続け、膜形成は起こさなかった。

15日目には、胚の発達は初期から後期の "torpedo" 型まで観察された。胚乳は "basal endosperm" を除いて総てに膜形成がみられた。"basal endosperm" と胚乳中の澱粉粒は胚の発達がよくなる程減少しているのがみられた。

18日目と21日目、胚は "torpedo" 型から "up-turned U" 型を示し、ほとんど成熟期に達した。胚の発達度合に関しては、"basal endosperm" の量的な差異がかなりみられ、よく発達した胚珠ではほとんど存在しなかった。

II. $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$: 顕微鏡観察の結果、
交配後 1 日目では $2x \times 4x$ では 10 莖中の 198 粒
の胚珠で僅かに 20 粒、 $4x \times 2x$ で同じ 10 莖中の
239 粒の胚珠中に 43 粒の受精した胚珠がみら
れた。

3 日目では、正逆交雑ともに 1 細胞から 2 細胞
の幼胚が観察され、いずれの交配でも 10 から
150 の胚乳核を数えた。栽培粒は $2x \times 4x$ では
 $4x \times 4x$ の交配と同程度であったが、 $4x \times 2x$ では
特に多く観察された。

6 日目になると、幼胚の細胞数は 1 細胞から
15 細胞まで数えられるが、胚の発達には正逆
交雑と、その両親の交配との間に差異はみら
れなかった (表 9, 図 2)。この時期の胚乳
核は $2x \times 4x$ では 180 から 1000 で、対照区 ($2x$
 $\times 2x$ と $4x \times 4x$) と較べると、胚乳の発達は良
くなっていることが分かったが、膜形成はまだ
観察されなかった。一方 $4x \times 2x$ では、1 つ
の胚珠中に約 50 から 350 の胚乳核が観察され
た。これはいずれの交配よりも核分裂が非常

に遅れを起していることを示している。しかし或る胚珠の胚の周辺の胚乳では膜形成が起まっているのが観察された(図4m)。また"basal endosperm"の発達も余りみられなかったが、特別に異常の観察された胚珠はなかった。受精卵は $4x \times 4x$ よりも少ないが、 $2x \times 2x$ や $2x \times 4x$ よりも多く存在した。

交配後9日目、幼胚は球型を呈し対照に($2x \times 2x$, $4x \times 4x$)ととの正逆交雑との著しい差異はみられなかった(表9, 図2)。 $2x \times 4x$ の胚乳核の発達の程度は $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ との中間に位置していた。 $2x \times 4x$ の胚珠の或るものでは、胚の周りの胚乳に退化現象の初期のものと思われる小点を、多数の、或は比較的大きな皇胞がみられた(図4d)。 $4x \times 2x$ では全面的に膜形成を起している胚乳がみられたが、胚の周辺ばかりでなく、胚珠全体にわたって胚乳は非常に少なかった(図4n)。胚乳核の増殖は6日目以後ほとんど止ってしまいうように認められた(図3)。またこの時期

に、膜形成を起した胚乳が消失して、胚だけ残って萎縮してゐる胚珠も観察された。

12月日には、 $2x \times 4x$ の胚の発達状態は依然として球型で、9日目以後 $4x \times 2x$ 又は対照区 ($2x$ と $4x$) と較べて遅れてゐるようと思われた (図2, 表9)。 $4x \times 2x$ の少数の胚は "heart" 型の段階まで達するものもみられたが、大抵のものは球型のままで留まつてゐて、胚柄が胚から離れて崩壊してゐるのが観察された (40, 4p)。しかし、 $2x \times 4x$ よりもよい発達を示してゐた (表5, 図2)。 $2x \times 4x$ の交雑では、胚乳の空腔が胚の周辺部 (図4e) のみならず、胚乳の各部に (図4f) みられた。とり特に胚の周辺 (図4g), 或は胚嚢に添つた部位 (図4h) の胚乳に著しい崩壊が始まつてくるのが観察された。 "basal endosperm" はほとんど発達してゐないことを除けば対照区のそれと同じであつた。この時期において、胚乳の膜形成はみられなかつた。 $4x \times 2x$ の胚乳の退化現象は、この時期になると大巾に遅れ、或

る胚珠では種皮が萎縮してしまつて、胚乳が全く観察されなゝものもあり、また他の胚珠ではヘマトキシリンで黄褐色を呈する成分不明の顆粒を食んだ細胞質が、部分の胚珠の内部を満してゐるもの(図4p)がみられた。

"basal endosperm"には澱粉粒が認められなかつた。

15日目では、 $2x \times 4x$ の胚は太極は依然として球型を示し、亦たおよそ $2x \times 2x$ や $4x \times 4x$ の交配後12日目のものに対応してゐた。観察した胚のうち2, 3の胚珠では胚が"heart"型に達するものもみられただが、胚乳の膜形成はこれらのものでも起こらなかつた。太極の胚乳には巨大核や、多数分散した核質塊は染色物質が観察された。 $4x \times 2x$ の多くの胚珠は胚や胚乳の存在がみられずに、空になり萎縮してしまつてゐた。

18日目と21日目、 $2x \times 4x$ の胚の発達状態は15日目のものと変わりがなく、胚が既に胚珠から脱落してしまつたと思われ、多くの胚がみられた。この時期になつても胚乳の膜形成

はみられず、若し「崩壊」をまぬかれば胚乳の中には、胚乳の周辺に胚乳核が寄つてしまうもの(図4i)や、多くの染色体顆粒を含む巨大核の出現するものが観察された(図4j)。更に崩壊が進行すると、胚乳および胚乳核の崩壊が胚乳全面に起つてくるのがみられた(4k)。また"basal endosperm"も次第に崩壊して来ているのが観察された(図4l)。4x x 2xの交雑では、この時期になると胚珠の中味はなくなり、種皮は著しく萎縮してしまつてゐた。

各交雑における胚乳の発達段階の変化を大きくまとめると表8のようになる(表8)。

正逆交雑とその両親の交配の胚と胚乳の発達 の比較

正逆交雑とその両親(2xと4x)の種々の段階での胚の発達状態を、胚の細胞数と大きさで測定した(図2, 表9)。また大きさを測

Table 8. Endosperm development in 5-21 days after pollination in reciprocal crosses and their parents (2x and 4x)

Cross	Days after pollination				
	3	6	9	12	15 18 and 21
<u>2x</u> x <u>2x</u>	developing endosperm			initiating cell wall formation	cell wall formation in whole part digested
<u>4x</u> x <u>4x</u>	developing endosperm			initiating cell wall formation	cell wall formation in whole part digested
<u>2x</u> x <u>4x</u>	developing endosperm		many abnormal vacuoles	beginning collapse	abnormalities of nuclei and cytoplasm
<u>4x</u> x <u>2x</u>	developing endosperm	initiating cell wall formation	cell wall formation in whole part	beginning degeneration	disintegrated

Table 9. Comparison of embryo development in reciprocal crosses and their parents
(2x and 4x)

Cross	Days after pollination						15 Shape	18 and 21 Shape
	3 Range (Av.)	6 Range (Av.)	9 Range (Av.)	12 Range (Av.)	Shape			
2x × 2x	E: 1-2	E: 1-8 (4.44 ± 0.76) S: 3-7 (4.42 ± 0.81)	T: 2-8 (6.14 ± 0.49) L: 2-7 (5.07 ± 0.38) S: 5-7 (6.33 ± 0.18)	T: 10-17 (15.10 ± 0.67) L: 8-18 (14.70 ± 0.89) S: 6-9 (7.67 ± 0.49)	globular- early heart- shape	early "torpedo"- "torpedo"	"torpedo-" "upturned U"	
4x × 4x	E: 1-2	E: 2-8 (4.75 ± 0.72) S: 4-7 (5.12 ± 0.35)	T: 3-12 (6.68 ± 0.42) L: 3-11 (5.92 ± 0.37) S: 6-10 (7.86 ± 0.29)	T: 10-20 (14.10 ± 1.09) L: 9-20 (13.60 ± 1.08) S: 5-10 (7.33 ± 1.76)	globular- heart- shape	"torpedo"- "late torpedo"	"late torpedo"- "upturned U"	
2x × 4x	E: 1	E: 1-15 (5.40 ± 0.53) S: 2-7 (4.61 ± 0.27)	T: 4-8 (5.55 ± 0.25) L: 3-7 (4.60 ± 0.26) S: 6-11 (7.53 ± 0.28)	T: 9-12 (10.00 ± 0.24) L: 5-8 (7.33 ± 0.49) S: 5-8 (7.00 ± 0.65)	globular	globular- "flat top"	globular- "flat top"	
4x × 2x	E: 1-4	E: 2-12 (4.49 ± 0.38) S: 2-8 (4.44 ± 0.35)	T: 4-8 (5.55 ± 0.25) L: 3-7 (4.60 ± 0.26) S: 6-11 (7.53 ± 0.28)	T: 6-18 (12.13 ± 0.88) L: 6-18 (11.42 ± 0.99) S: collapse	globular	globular	disintegrate	

E: Total number of cells in the whole embryo.
T: Number of cells along the transverse section at central axis of the main body of embryo.
L: Number of cells along the longitudinal section at central axis of the main body of embryo.
S: Total number of cells in suspensor.

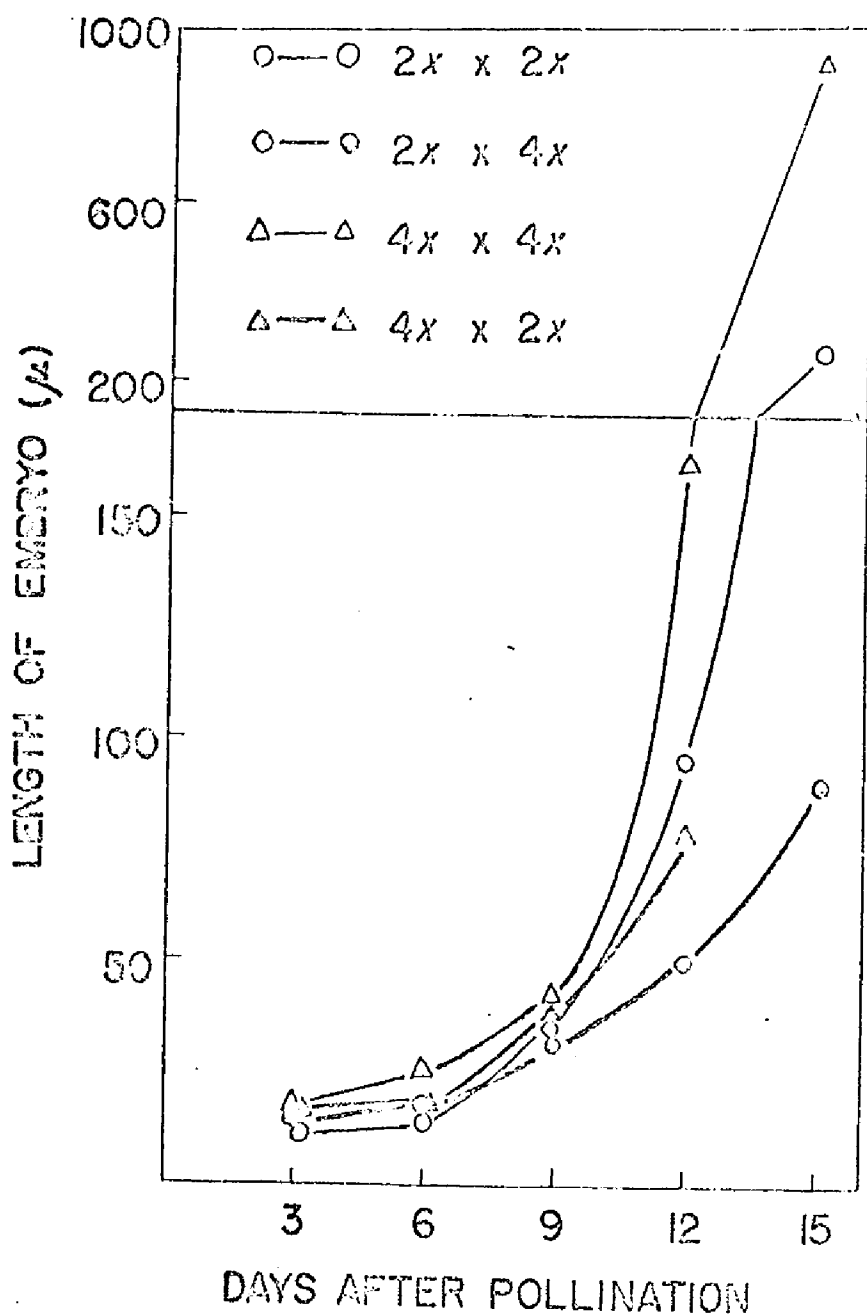


Fig. 2. Growth rate of embryos in reciprocal crosses between diploid *Brassica campestris* ($2x$) and its autotetraploid ($4x$).

定し胚珠の数と表10に示した(表10)。表

Table 10. Number of ovules used for measuring the growth rate of embryo

Cross	Days after pollination				
	3	6	9	12	15
$2x \times 2x$	2	5	10	12	7
$2x \times 4x$	5	12	10	9	7
$4x \times 4x$	2	7	10	9	5
$4x \times 2x$	9	10	10	10	-

9の結果のよう

に、交配後3日

目から6日目ま

では、胚の全細

胞数を調査した

が、9日目とど

れ以後では、胚の主軸の縦と横の細胞数のみと調べた。また胚柄の細胞数も含め測定した。

9日目の幼胚の細胞数によると、両親ととの正逆交雑の間の生育の割合は、大体同程度であるが、12日目には両親の胚は球型から"heart"型への変化を示すのに対し、雑種の胚は少し発達が遅れて球型のままだ。15日目になると $4x \times 2x$ では、大概の胚珠が空になつてしまふのが観察された。 $2x \times 4x$ の15日目では、僅かの胚は"flat top"型まで発達したが、大概のものは球型のままだが発達が非常に遅れるか、或はほとんど止まつてしまった。胚柄の長さも特に観察されなかったが、 $4x \times 2x$ において

のみ崩壊して胚から細胞するのが観察された。

交配後1日目から9日目までの胚乳核の数を測定し、その平均値を図3に示した。またこれに用いた胚珠の数を表11に挙げた(図3, 表11)。

交配後1日目から3日目までは、胚乳核の平均値の差は必ずこの交配の間でもみられなかった。6日目には胚乳核の最も多い組合せは $2x \times 4x$ で、最も少ないものは $4x \times 2x$ であった。両親の $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ は大体同じで、正交交雑の中間の値を示した。しかしながら9日目になると $2x \times 2x$ の胚乳核の数は $2x \times 4x$ と $4x \times 4x$ よりも多くなるのが分かった。胚乳核の発達差は2倍性と4倍性によって特徴づけられるといえる。交配後6日目という初期の発達段階では、花粉親に用いた個体が、母親に使用された個体よりも多い染色体数($2x \times 4x$)を持つときは、胚乳の発達速度は増加する。また母親に用いた個体よりも花粉親に用いた個体の染色体数が少ないとき($4x \times$

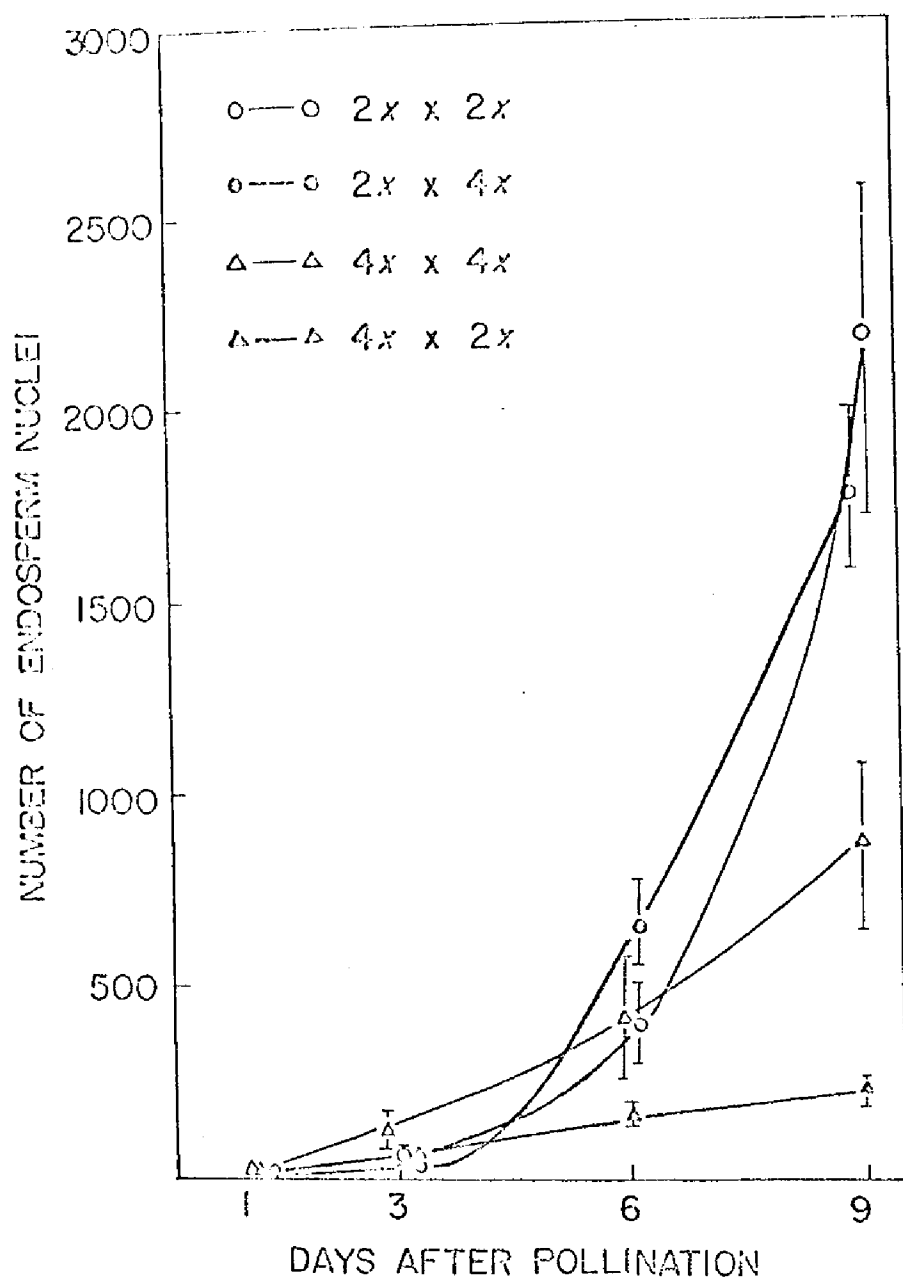


Fig. 3. Average number of endosperm nuclei in reciprocal crosses between diploid *Brassica campestris* ($2x$) and its autotetraploid ($4x$), — show 95% fiducial intervals.

Table 11. Number of ovules used for counting the number of cells of endosperm

Cross	Days after pollination			
	1	3	6	9
$2x \times 2x$	-	8	50	28
$2x \times 4x$	20	59	57	23
$4x \times 4x$	2	10	12	17
$4x \times 2x$	43	45	66	35

$2x$ は胚乳核の発達
は抑えられた。

とし、それ以後

の発達段階では、

$2x \times 4x$ で胚乳の

正常な発達がおこ

れることが観察された。また $4x \times 2x$ では膜形成は初期に起るが、以後胚乳全体の発達が盛くなってしまう。とし、遂に正途を執とも生育可能な種子をつけることがなかった。

(ii) 胚珠の人工培養に伴う胚発生

Papaver (Maheshwari 1958) にあいて、胚珠の植込込まれた時期は2細胞の幼胚の時期であり、植込込んだから9日目には膜形成の起る胚乳と球型の胚の発達が見られ、生育可能な種子が得られたが、生育期間は無自然条件の場合よりも長期にわたった。同じ材料の Papaver を用いて試験管中受精を行なうと、胚珠内の胚が

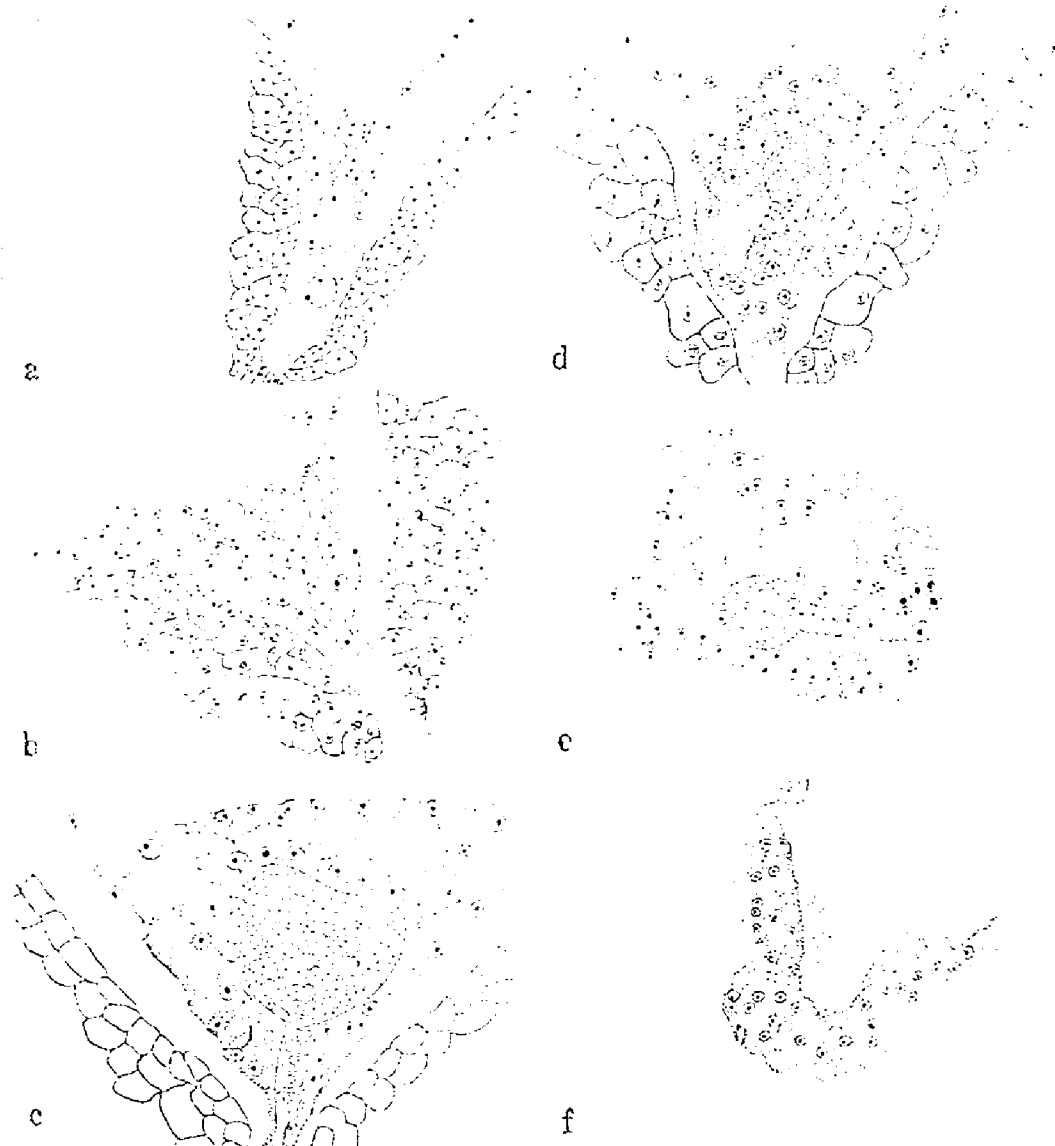
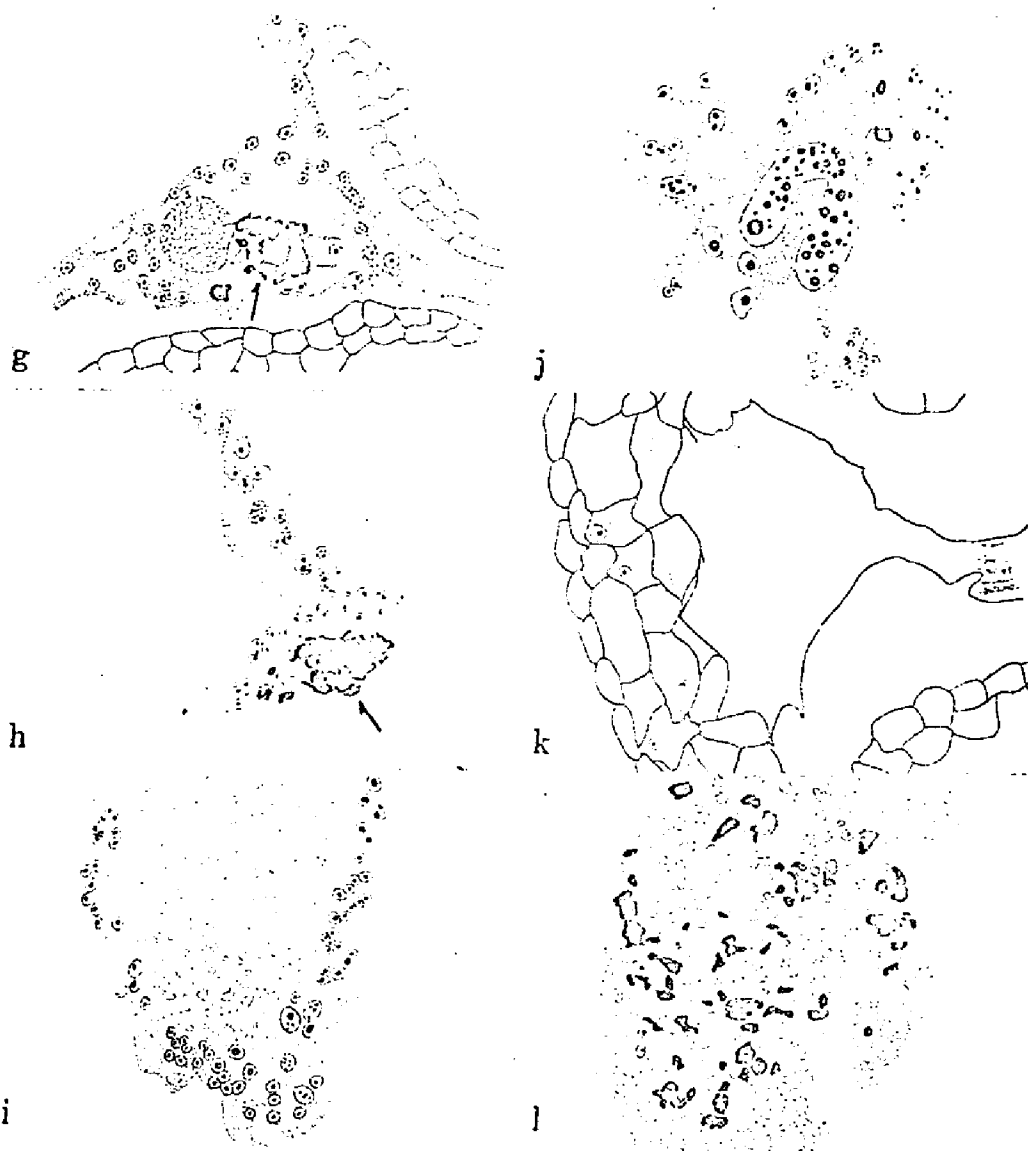
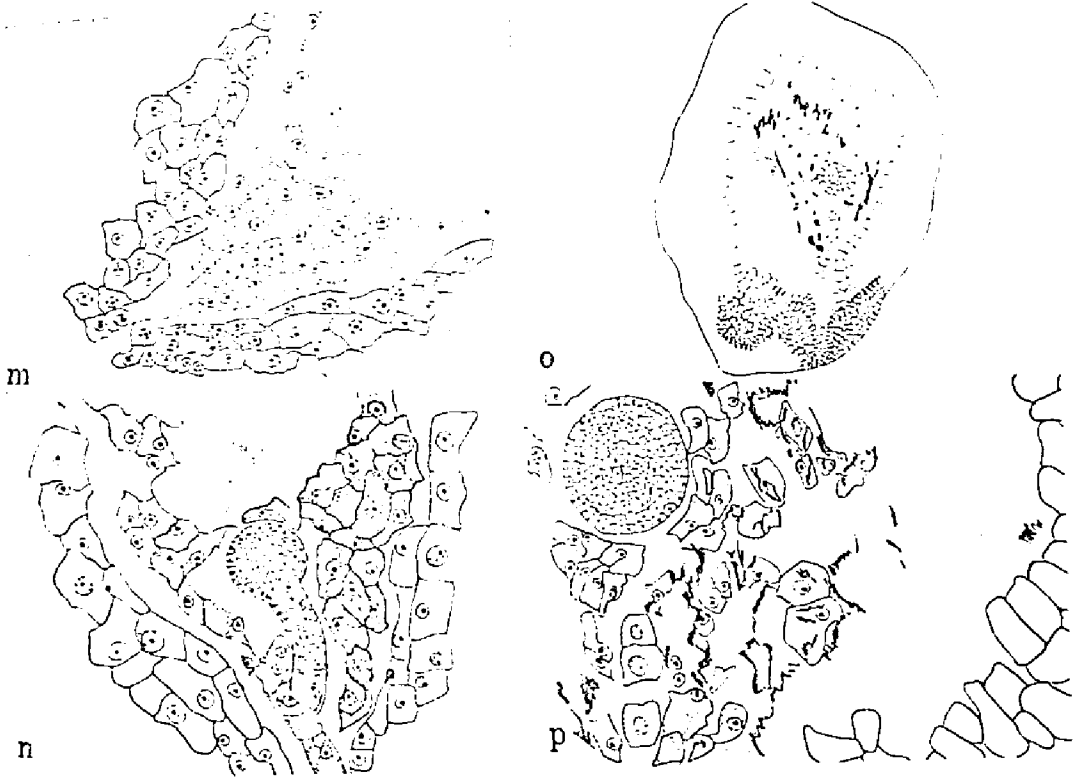


Fig. 4. Embryo and endosperm in various developmental stages.

- $2x \times 2x$, 6 days after pollination. Four or five-celled proembryo.
- $2x \times 2x$, 9 days after pollination. The endosperm was dense near the embryo.
- $2x \times 2x$, 12 days after pollination. Cell wall formation occurred in the endosperm near the embryo.
- $2x \times 4x$, 9 days after pollination. Vacuoles in the endosperm near the embryo.
- and f. $2x \times 4x$, 12 days after pollination. Conspicuous vacuolization in the endosperm. No cell wall formation in the endosperm.



- g. $2\times \times 4\times$, 12 days after pollination. Endosperm collapse (arrow) near the embryo.
- h. $2\times \times 4\times$, 12 days after pollination. Endosperm collapse (arrow), especially showing giant nuclear masses.
- i. $2\times \times 4\times$, 18 days after pollination. Numerous nuclei congregated at peripheral side of endosperm.
- j. $2\times \times 4\times$, 18 days after pollination. Giant nucleus containing many chromatin particles.
- k. $2\times \times 4\times$, 18 days after pollination. Degenerating stage of the basal endosperm.
- l. $2\times \times 4\times$, 21 days after pollination. Collapse of nuclei in the endosperm.



- m. $4x \times 2x$, 6 days after pollination. 4-celled proembryo and cell wall formation was initiated in the endosperm.
- n. $4x \times 2x$, 9 days after pollination. Poor endosperm development near the embryo. Cell wall was formed.
- o. $4x \times 2x$, 12 days after pollination. Collapse of endosperm and an embryo.
- p. $4x \times 2x$, 12 days after pollination. The similar collapse, and unidentified yellow-stained granular cytoplasm were observed.

発達は自然条件下のそれよりも良かった

(Kanta and Maheshwari 1963)

ここでは、2倍体のニ貧目体菜と同質4倍体の4-フ白菜の交配後の胚珠を人工培養し、in vitroでの胚・胚乳と胚珠の発達過程を研究した。

方 法

胚珠の培養に用いた基本培地は Mitsch (1951) の培地で、これにビタミン、アミノ酸類として、ナイアシン 0.5mg 、ピリドキシン 0.5mg 、ナイアシン 2.5mg 、グリシン 15mg をそれぞれ1当たりにつき添加した。そして必要に応じてこの基本培地には IAA、カイネチン、ジベレリン等を添加した。また栄養物質としてトマトジュースやイースト抽出物を添加した。IAA、カイネチン、ジベレリン等の添加の濃度と方法を表12に示す(表12)。トマトジュースは無添加のものを対照区(T-1)として15%(T-2)と25%(T-3)、

Table 12. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. ¹⁾
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

イスト抽出物は
2g/l (Y-1) の割合
合でそれぞれ
基本培地に添
加した。

試験管内に
無菌的に植之
込んだ胚珠は
2倍体の=食
目体菜および、
4-7白菜の
同便4倍体で、

$2x \times 2x$, $4x \times 4x$,

$2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交配を、除雄後2日目に行
なった。

先に述べた組織学的観察結果から、交配後
の胚の発達は9日目までは対照区 ($2x \times 2x$ と
 $4x \times 4x$) とその正逆交雑とでは差がなくて
(表9, 図2), 胚乳の発達状態とみても差
"異常がみられな" また、更に3日後の

12日目になると胚乳の崩壊が著しくなることが分ったので、上記のように交配後9日目の胚珠を本実験の人工培養に用いた。

植之とんぼ胚珠の胚・胚乳の発達を自然条件下でのものと比較する目的で、交配後15日目（移植後6日目）に各胚の試験管から1〜4粒の胚珠を取り出し、固定しその発達状態をパラフィン切片法によって作製しニプロラートを用いて、顕微鏡的に観察した。

結 果

自然条件下では交配後9日目の胚は球型で、15日目になると"late torpedo"型にまで発達する。この時期の胚乳は"basal endosperm"を除いて全面的に膨形成がみられる。

IAA とカイネチンを添加した培地で人工培養した胚珠では、植之とんぼ当初（交配後9日目）から少しも発達したと思われないう胚が $2x \times 2x$ (K-4, K-6, K-9), $4x \times 4x$ (K-3, K-4, K-9) 亦

が $4x \times 2x$ ($K-1$) で観察した。また既に胚が消失して見当らないう胚珠も多くのがみられた。

特に $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ においては、 $K-1$ を除く総々の培養基組織の区で胚の存在する胚珠は観察出来なかった。 $4x \times 4x$ の $K-5$ の区には、
 2 は、胚珠の中の胚全体の発育はほとんど認められないうにも拘らず、胚を構成する各細胞が異常にふくれ、胚形成の機能を失って、膨瘍状を呈しているのがみられた(図5b)。

$2x \times 2x$ の $K-9$ の区では、球型の胚の胚柄の各細胞が肥大しているのがみられた(図5c)。

胚乳は胚珠に全く存在しないもの、消失寸前のもの、膜形成を起しているが僅かしか存在しないものなどが認められた。胚の発育や分化が認められないう胚珠の胚乳が膜形成を起しているものもあった。 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ では胚珠のほとんどすべてが萎縮していた。胚珠中には胚も胚乳もみられないうにも拘らず、胚珠全体の形が丸いものもあったが、内皮が発達して胚嚢を押し潰してしまっているものも

観察された。

IAA とジベレリンとを添加した培地での胚の発育状態は、植えてみ当初（交配後9日目）から余り発育してゐないと思われる球型のものが、 $2x \times 2x$ では G-1, G-2, G-4, G-7 で、 $2x \times 4x$ では G-2 で、 $4x \times 4x$ では G-1, G-5 の各胚で観察され、"early heart" 型のものが $2x \times 2x$ の G-5 区で見られた。それ以外の胚球では、胚球中には胚の存在が確認されなかった。存在する胚は未発育という以外は異常が認められなかったが、しばしば胚柄の異常がみられた。この異常は胚柄細胞が肥大するもので、 $2x \times 2x$ の G-4 と G-7 において観察され、 $2x \times 2x$ の K-9 に見られる異常と同種であった（図5c）。胚乳の状態は、膜形成を起して僅かに存在するものが、 $2x \times 2x$ の G-1, G-6, G-7 と、 $2x \times 4x$ の G-1 にみられただけで、他は総て胚乳の存在が確認できなかった。胚の存在する胚球でも胚乳のないものがみられ、胚珠の形は萎縮してゐた。胚乳だけ存在して、胚の見当らな

な胚珠はなく、胚珠の内皮の細胞が部分的に肥大しているものもみられた。

トマトジューズとイースト抽出物を基本培地に添加した培地では、胚の発達は "heart" 型 ($2x \times 2x$ の T-3) から、植え込んだ当初から少しも発達していないと思われる胚 ($4x \times 2x$ の T-1, Y-1, $2x \times 2x$ の T-2, $4x \times 4x$ の T-3) まで観察された。発達した胚の中には細胞分裂のみが起こって、胚の分化を伴わないものが $4x \times 4x$ の T-3 と $4x \times 2x$ の T-1, Y-1 とみられた (図 5d)。 $4x \times 4x$ の T-3 位の胚珠では、別の型の胚柄の異常がみられた (図 5d)。一般的に Brassica の胚の発達は、胚柄は通常 1 つずつの細胞が重なって 7 から 8 細胞で形成されている (図 5a) が、ここでは 1 つの細胞が軸に直角の方向に分裂して 2 つの細胞が横に並んでいる胚柄を持ったものがみられた。胚乳は胚の発達の如何を問わず、ほとんど存在しないか、全く存在しないかであった。種皮が丸く発達しているものでも、胚も胚乳も存在し

ない胚珠が多数みられた。特に $2x \times 4x$ では、いずれの区においても胚、胚乳がみつからず、15日目では観察すべき胚珠がなかった。また内皮細胞の肥大がみえる胚珠が認められた。

以上の結果をまとめて表13に示す。この表では4つの異なった交配組合せをまとめて示した(表13)。

(iii) 子房の人工培養に伴う胚発生

未熟種子の崩壊ということとは、高等植物においては頻繁に起る現象で、Brassica campestris L. の群の $2x$ と $4x$ の正逆交雑においては、通常どちらの組合せにおいても交雑種子は得られない。これは胚珠の発達初期の異常による(Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus sativus においては、 $4x \times 2x$ の交配の時には $2x \times 2x$ あるいは $4x \times 4x$ の種子よりも小粒の3倍体種子が得

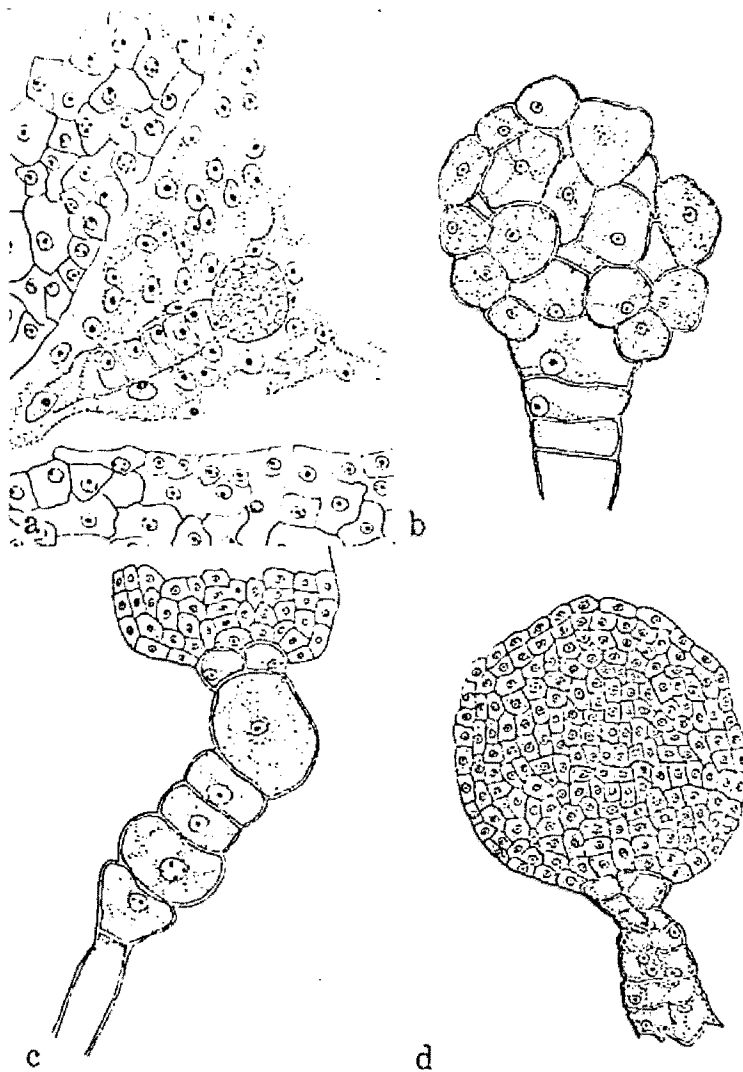


Fig. 5. Embryo in cultured ovule.

- a. Normally developed "embryo, embryo, suspensor and endosperm, in nine days after pollination.
- b. All cells of embryo swelled anomalously (in $4x \times 4x$).
- c. Anomalously swelled suspensor (in $2x \times 2x$).
- d. Undifferentiated embryo and another type of anomalous suspensor (in $4x \times 4x$).

Table 13. Embryological observations in four cross combinations of cultured ovules in the various media

1) Medium	No. of ovules examined	Developmental stages of embryo	Condition of endosperm	Shape of ovule
K-1	6	no~globular	not existed	shrivelled~round
K-2	9	not existed	no~very poor	"
K-3	10	no~globular	no~poor	"
K-4	8	"	not existed	"
K-5	13	"	no~poor	"
K-6	6	"	not existed	shrivelled
K-7	9	not existed	"	shrivelled~round
K-8	8	"	"	"
K-9	9	no~globular	no~poor	"
G-1	8	no~globular	no~poor	shrivelled~round
G-2	8	"	not existed	"
G-3	10	not existed	"	shrivelled
G-4	11	no~globular	"	shrivelled~round
G-5	13	no~flat top	"	"
G-6	12	not existed	no~very poor	"
G-7	11	no~globular	"	"
G-8	11	not existed	not existed	"
G-9	8	"	"	"
T-1	10	no~globular	no~very poor	shrivelled~round
T-2	7	"	"	"
T-3	11	no~heart	not existed	"
Y-1	13	no~globular	no~very poor	shrivelled~round

T-1: Basal medium only (=K-1, G-1).

T-2 and T-3: Tomato juice added 15% and 25% respectively.

Y-1: Yeast extract 2g/l.

1): Refer to Table 12.

られるが、逆交雑の $2x \times 4x$ では生育可能な種子が得られない。この場合も発芽初期において胚乳の組織学的な異常が観察される。種子発達の過程における崩壊のうちの原因は胚ではなく、胚乳の異常にあることは確かである (Inomata 1970)。

胚乳の異常に伴って発芽初期の種子の崩壊がみられることから、胚珠の発達の或る時期に胚のみを取り出して、胚培養を行なう雑種個体と得ることが可能であろう。この他に、胚・胚乳とそれと包む内皮とを含む、胚珠全体の問題として研究する必要があると思われる。

ここでは子房と種々の組織の培養基に植え込み、発達の途中の段階で固定し、その組織学的観察を行なった。そしてこれらの胚・胚乳の発達状態を自然のものと比較研究した。

方 法

2倍体のニゲル目体菜と同量4倍体の4-フ

白菜を実験に供し、 $2x \times 2x$, $4x \times 4x$, $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交配を行なった。

交配にあつては、材料をガラス室に移し、除雄した蕾を硫酸紙で被つて隔離し、除雄後2日目には開花当日の花粉を人工的に授粉した。子房の培養に適當な発達時期は、胚・胚乳の発生学的研究のデータに基づいて決定した(図2と3)。交配後4日目までは、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の胚・胚乳の発達は対照区($2x \times 2x$ と $4x \times 4x$)と同じである。この時期は植物体から子房を切り取り殺菌後(2(IV)参照)あらかじめ用意した培養地に植え込んだ。

用いた基本培養地は Nitsch (1951) の培養地にグリシン 15 mg , ナイアシン(ニコチン酸) 2.5 mg , ピリドキシン 0.5 mg , サイアミン 0.5 mg , サツカロース 50 g , 鉄分 9 g を各々 / リットル当りに添加したものである。また必要に応じて生長調整物質や他の栄養分を加えた。用いたものは、IAA, カイネチン, ジベレリン, トコトジユース, イースト抽出物, カゼイン酸分

解物とココナツトミルクである。これらを種々に組合せて調整した培養基の名称と組成を表14と表15に示す(表14, 15)。表14と表15

Table 14. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. ¹⁾
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

以外にトマト

ジュース 15%

(T-2)と25%(T-3),

イースト抽出

物(2g/l)を添加

した培地も

使用した。培

地の pH は高圧

滅菌前 1N-KOH

又は 1N-HCl を

用いて 6.0 に調

整した。高圧

滅菌は 1.2kg/cm^2

で 10 分間行なった。用いた試験管は $18 \times 180\text{ mm}$ のもので各試験管に 10 cc ずつ培養基を注入した。用いた IAA は西独メルク社, カイネチンはアメリカのシグマ社, ジベレリンは日本ギ

Table 15. Composition of enriched media for culturing excised ovaries

	None	IAA	K	GA	T
BM	NO	NI	NK	NG	NT
BM-TJ	TJO	TJI	TJK	TJG	TJT
BM-YE	YEO	YEI	YEK	YEG	YET
BM-Ch	ChO	ChI	ChK	ChG	ChT
BM-CM	CMO	CMI	CMK	CMG	CMT
BM-CM-Ch	CMChO	CMChI	CMChK	CMChG	CMChT

IAA: 1mg, K: kinetin 0.1mg, GA: gibberellin 1mg, T: IAA+K+GA, BM: basal only, TJ: tomato juice (15%), YE: yeast extract (2g/l), Ch: casein hydrolysate (300mg/l), CM: coconut milk (10%), CMCh: casein hydrolysate+coconut milk.

ベレリと協会, イースト抽出物は武田薬品, カゼイン酸分解物は日本製薬の製品である。きんぴらトマトジュースは市場から求めた完熟トマトを砕き, 綿布でこして 1.2kg/cm^2 で10分高圧滅菌を行なった保存したとき, 実験のときに凍結物とろ化して用いた。ココナットミルクも市場から求めたとき, ココヤシの果実から得たミルクを 1.2kg/cm^2 で10分間高圧滅菌して冷蔵庫に保存したものを供した。

植えこんだ子宮房は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で, 300-500 ルクス

遠鏡照射の蛍光灯のもとに静置した。胚・胚乳等の組織学的研究にあつては、植え込み後11日目（交配後15日目）に果腹を1匹についで1個体の子房を固定し、パラフィン切片と作製して顕微鏡観察に供した（1(i) 参考）。

結 果

胚発生組織学的研究

トマトジュース(15%と25%)とイースト抽出物(2g/l)を添加した培地に植え込んだ子房の胚・胚乳・胚珠の発育を調べた。その結果の概略を表16および表17に示す。表16には $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の結果を、表17には $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の結果を示した(表16, 17)。

トマトジュースと培地に添加した場合には、 $2x \times 2x$ にあつては胚が胚珠中に存在しなもののから、"torpedo" 型に発達したもののまづ13個の段階のものがみられた。"Torpedo" 型の胚

Table 16. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of $2x \times 2x$ and $4x \times 4x$ in the medium added with tomato juice and yeast extract

Medium ¹⁾	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
T-1	8	not existed (5)~ "upturned U" (1)	not existed~ normal	shrivelled~ round
T-2	7	not existed (4)~ late "torpedo" (1)	not existed~ poor	shrivelled
T-3	13	not existed (10)~ "flat top" (1)	not existed~ poor	shrivelled
Y-1	2	"flat top" (1)~ "torpedo" (1)	poor ~ normal	round

- 1): T-1, basal medium only. T-2, basal medium added 15% tomato juice. T-3, basal medium added 25% tomato juice. Y-1, basal medium added yeast extract (2g/l).
 2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

Table 17. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 4x and 4x x 2x in the medium added with tomato juice and yeast extract

Medium	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
T-1	14	not existed (4)~ heart shaped (2)	not existed~ poor	shrivelled~ round
T-2	10	not existed (7)~ globular (3)	not existed	shrivelled
T-3	16	not existed (11)~ globular (5)	not existed	shrivelled
Y-1	15	not existed (14) globular (1)	not existed~ poor	shrivelled~ round

- 1): T-1, basal medium only. T-2, basal medium added 15% tomato juice. T-3, basal medium added 25% tomato juice.
 Y-1, basal medium added yeast extract (2g/l).
 2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

を持つ胚珠にあつては、その胚乳は臃形を
 示したが、量的には僅かしか存在せず、胚珠
 全体が萎縮してゐた(図6a)。胚が存在して
 も胚乳のない胚珠もみられた。4x x 4x の交配
 においては、"upturned U" 型の胚がみられ、ほと
 んど成熟種子に達してゐた。これは自然条件
 下の胚珠の発達の後2日目のものに相
 当してゐた。臃形成とした胚乳はほとんど残
 つてゐなかつた。"torpedo" 型または"late torpedo"
 型の胚を持つ胚珠では、臃形成した胚乳がみ
 られたが、発達状態が良好でないので、胚珠
 全体の形は萎縮してしまつてゐた(図6b)。
 25%のトマトジュースを添加した区においては
 "flat top" の胚が観察されたが、その胚乳は既に
 消失してあり、僅かに基部胚乳(basal endo-
 sperm)を残すだけであつた。

2x x 4x の交配の場合には、多数の胚珠を観
 察したにも拘らず、どの培養区においても、
 胚・胚乳共に胚珠中に存在しなかつた。

4x x 2x の交配では、胚の発達は球型から

"heart" 型までみられたが、そのほとんどが球型を呈してゐた。分化をせず"に球型のまま胚が生長してゐるものもみられた(図6b)。胚柄の異常な発達のみられた(図6c)が、これは胚珠の培養に於いてみられたものである(図6d)。
"heart"型の胚を持つ胚珠以外はこの胚珠にも胚乳がなく、観察された胚珠は總じてあつて萎縮してゐた。

イースト抽出物を培地に添加したものに於ては、胚は $2x \times 2x$ 又は "torpedo" 型に、 $4x \times 4x$ 又は "flat top" 型にまで発達したものがみられた。前者の "torpedo" 型は自然条件下での胚の発達に於いて、交配後18日目には相当するものであり、そして胚珠の胚乳の発達もよく、自然条件下のそれと同等であつた。後者の "flat top" 型は自然条件下での交配後約12日目には相当し、その胚乳は図6eのように中心部にあつて崩壊してしまつてゐた。 $2x \times 4x$ の交配に於いては、いずれの胚珠中にも、胚と胚乳の存在がみとめられなかつた。そして胚珠の若くは萎縮

がみられず。 $4x \times 2x$ の交配においては、変形した胚がみられ、その胚乳の膜形成は胚の周辺と胚嚢に添った胚乳のみみられず、"basal endosperm" のみみられず、中心部位においては胚乳は完全に崩壊してゐた(図6e)。

IAA とカイネチンとの相互作用を調べた結果を表18と表19に示す。表18は $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ 、表19は $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ についてその結果を概略的に示したものである(表18, 19)。 $2x \times 2x$ の交配においては、胚が存在しないで、胚珠が萎縮してしまつてゐるもののみみられたが、最も良く発達した胚の状態をみると、培養組織に如えた IAA の濃度が高まるに従つて(即ち K-3, K-6 と K-9)良くなり、自然条件下での胚の発達と較べた場合、最も良く発達したものは約1週間発育が早くなり、ほとんど成熟に近い状態を示した。"Heart" 型や"torpedo" 型の胚も観察されたが、これらの胚珠の胚乳はほとんど存在せず、膜形成は認められたが、種皮は完全に萎縮してゐて図6a の如き様子を呈し

Table 13. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 2x and 4x x 4x in the medium added with IAA and kinetin

Medium ¹⁾	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
K-1	8	not existed (3)~ "upturned U" (2)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-2	10	not existed (4)~ "upturned U" (3)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-3	5	"torpedo" (2)~ "upturned U" (2)	poor~ normal	shrivelled~ round
K-4	10	not existed (7)~ heart shaped (1)	not existed~ poor	round
K-5	2	late "torpedo" (2)	normal	round
K-6	3	not existed (1)~ "upturned U" (2)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-7	3	not existed (2)~ "waking stick" (1)	poor~ normal	shrivelled~ round
K-8	4	not existed (3)~ early "torpedo" (1)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-9	4	late "torpedo" (1)~ "upturned U" (3)	normal	round

1): Refer to Table 14.

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

Table 15. Seed coat in the crosses of $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$ in the medium added with IAA and Kinetin

Medium ¹⁾	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo ²⁾	Developmental condition of endosperm	Seed coat
K-1	9	not existed (3)~ globular (1)	not existed	shrivelled
K-2	3	not existed (1)~ early "torpedo" (1)	not existed~ poor	shrivelled~ round
K-3	14	not existed (12)~ globular (2)	not existed	shrivelled
K-4	3	not existed (2)~ "upturned U" (1)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-5	2	not existed (1)~ "walking stick" (1)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-6	5	not existed (5)	not existed	shrivelled
K-7	5	not existed (2)~ "flat top"	not existed	shrivelled
K-8	12	not existed (9)~ heart shaped (1)	not existed~ poor	shrivelled~ round
K-9	2	not existed (2)	not existed~ poor	round

1): Refer to Table 14.

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

211 F。異常な胚乳の空胞化や巨大核の存在は認められなかつた。胚珠の肉皮の異常増殖が著縮してゆく胚珠にみられた(図6f)。

4x x 4x にはおいては、胚の発達は良く、K-4とK-8を除いた總2の2にはおいて自然条件下での発達の18日或いは21日目に相当するものがあった。

"late torpedo"の胚でも膜形成を起した胚乳の存在が僅かのために種皮の著縮しているものがあった(図6g)。またよく発達している胚珠にも胚の存在がみられず、膜形成を起した胚乳だけが一杯に満ちているのがK-7とK-8の残るもので認められた。胚珠の肉皮の異常に肥大したものを図6fのようにみられた。

2x x 4x の交配にはおいては、観察したどの胚珠にあつても胚が存在するものはなく、胚乳もまたほとんど見当らず、胚珠は著しく著縮していた。これに対し4x x 2x の交配では種々の発達段階を示す胚がみられた。即ちほとんど発達している"球型"、分化の遅れている球型、"heart"型、"torpedo"型と"upturned U"型があ

る。K-2, K-4 と K-5 の培養皿における各1粒ずつの胚珠の胚の発達は良好で成熟段階まで達すると思われた。この等の胚珠の胚乳には嚢形成や発達程度にも異常や違いがみられなかった。胚がなく胚乳だけが嚢形成を起してよく発達し、胚珠内には一杯満ちたものが K-9 の区で見られた。その内皮は図6cの如く異常増殖を示していた。

IAA とジベリリンと培養液に添加し、その拮抗作用を調べた結果を表20と表21に示す。表20は $2 \times 2 \times$ と $4 \times 4 \times$, 表21は $2 \times 4 \times$ と $4 \times 2 \times$ についての結果を示す。 $2 \times 2 \times$ においては、良好な胚の発達は G-2, G-3, G-4 の3区に見えられた。"early torpedo" 型実とは "late torpedo" 型の胚を持つ胚珠にあっては、胚乳はほとんど存在せず、種皮は萎縮し、図6bの如き様子を呈していた。 $4 \times 4 \times$ においては、胚の発達は $2 \times 2 \times$ よりも更に良好で、いずれの区においても成熟に達し、自然条件下の交配後18日から21日目の胚に相当するものであった。

Table 20. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 2x and 4x x 4x in the medium added with IAA and Gibberellin

Medium ¹⁾	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
G-1	4	Globular (1) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-2	3	heart shaped (1) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-3	3	early "torpedo" (1) ~ "upturned U" (1)	poor ~ normal	shrivelled ~ round
G-4	2	late "torpedo" (1) ~ "upturned U" (1)	normal	round
G-5	7	not existed (5) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-6	8	not existed (6) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-7	6	early "torpedo" (2) ~ "upturned U" (4)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-8	3	not existed (2) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-9	4	late heart (1) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round

1): Refer to Table 14.

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

Table 21. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$ in the medium added with IAA and gibberellin

Medium ¹⁾	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo ²⁾	Developmental condition of endosperm	Seed coat
G-1	7	not existed (7)	not existed	shrivelled~round
G-2	8	not existed (7)~globular (1)	not existed	shrivelled
G-3	4	not existed (2)~heart shaped (1)	not existed	shrivelled~round
G-4	10	not existed (9)~globular (1)	not existed	shrivelled
G-5	7	not existed (7)	not existed	shrivelled
G-6	10	not existed (10)	not existed	shrivelled~round
G-7	4	not existed (4)	not existed	shrivelled
G-8	4	not existed (4)	not existed	shrivelled
G-9	9	not existed (8)~globular (1)	not existed	shrivelled

1): Refer to Table 14.

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

本図 6b のように胚の発達は割合に速い。胚乳がほとんど胚珠中に存在せず、種皮の萎縮がみられるものもあつた。"heart" 型の胚を持つ胚珠に一部胚乳の異常がみられた (G-9) (図 6c)。胚乳の膜形成は胚周部のみで著し、他の部分では空胞化が著しく、核の局在が目立つた。"basal part" に胚乳核が多く存在するものは、その部分の胚乳が異常に増殖したためと考えられる。胚乳の異常な空胞化に伴つて偏在させられたものと思われる。

$2x \times 4x$ の交配においては、球型、"heart" 型の胚が G-2 と G-3 区で観察されたが、他の培養基組成の区では、胚の存在する胚珠が全くみられなかった。球型の胚を持つ胚珠の胚乳は既に消失して、内皮細胞の異常肥大が認められた。また "heart" 型を持つ胚珠では、胚乳の膜形成はなく、多くの異常な空胞化がみられた。 $4x \times 2x$ にあつては、球型と示す胚が 11 個、そのうちの胚乳は胚珠中に残存してゐなかった (G-3, G-4, G-9)。ほとんどの胚珠は

を維持してゐた。4x x 4x の交配では胚珠の異なる
な胚嚢がみられただ、正交交雑にあつては、
いずれも対照胚の形を胚嚢はみられなかった。

表15に示した種々の培地を用いて子房培養
を行つたものと組織学的に観察した結果の
うち胚の発達状態を表22と表23に示す。

基本培地には生長調節物質を添加したものの
うち 2x x 2x の交配にあつては、"late torpedo" 型
にまで発達した胚は、培地はジベレリンを添加
した胚でだけみられた (NG)。胚が球型のま
ま生長を続けるだけで、分化と起るとなり胚嚢
をみられた (NO) (図6e)。
"torpedo" 型を持つ
胚の胚乳は膜形成と起つてゐたが、球型の
胚をもつ胚珠では胚乳の膜形成はみられな
かつた。4x x 4x の交配では、2つの胚にあつて
胚が成熟に達してゐた (NO, NK)。
"heart" 型と
"early torpedo" 型の胚も他の胚珠にみられた。
IAA を添加した培地 (NI) では、2つの "heart"
型の胚が観察されたが、一方の胚は "basal
endosperm" を除いてすべてその胚乳に膜形成がみ

られただが、他初胚乳では全く隠形胚はみられず、また異常もなかった。胚珠の分泌が全体的に遅れているようにみえた。

$2x \times 4x$ の胚珠では最も良く発達したものの2つも球型の胚(NI, RT)があった。これらの胚を持つ胚珠の胚乳は量的に僅かであり、異常な状態にあった。胚は球型であるにもかかわらず崩壊を始めており、その胚乳は、特に胚乳付近において著しい崩壊を示した(図6)。胚乳の異常な空胞化と種皮の大きさの核とが観察されたが、これ等は自然条件での着床後には日目の胚珠に似ていた。 $4x \times 2x$ における胚の発達は球型までで、ほとんどの胚珠では胚が胚乳に消失してしまっており、種皮が著しく萎縮していた。そして球型の胚とせう胚珠の胚乳は存在せず、萎縮していた。

培地はトマトジュースと生長調整物質を添加した培地で培養した子房については、20個の胚珠を調査したがその結果、僅かに "early torpedo" 型の胚を2個($2x \times 2x$)と球型の胚を

2個 ($4x \times 4x$) 認めただけである。これらの胚を持つ胚珠のうち2個では胚乳の膜形成が認められた ($2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ 各1個) が、他は完全に萎縮してしまつていて、胚乳は残存してゐなかつた。

$2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ とに於いては、2つの胚珠を調査したが、胚の存在するものはいずれの培養地にも見当らず、胚乳もほとんどなく、胚珠は著しく萎縮してゐた。

イースト抽出物と生育調整物質の濃度を加したもののうち、IAA を含む培養地で培養した $2x \times 2x$ に於いて球型の胚のみが見られた以外は、総ての培養地で "torpedo" 型の胚が観察された。同じ "torpedo" 型の胚の中にも発達の差異があつた。球型の胚と持つ胚珠以外のものでは、つねに膜形成を起した胚乳が存在してゐた。 $4x \times 4x$ では種々の発達段階の胚が見られた。即ち "torpedo" 型, "flat top" 型, "heart" 型と球型胚がある。"torpedo" 型の胚は3種の培養地でみられた (YC, YK, YT)。これらの胚の発達の程度は自然

条件のものより幾分遅れてゐた。胚の発達の場合 ("heart" 型, "flat top" 型, 球型), その胚乳は崩壊して, ほとんど胚珠中に存在してゐなかつた。

$2x \times 4x$ では, 多数の胚珠と調つたにもかゝらず, 1粒の球型胚 (YL) がみられただけであつた。また胚乳は膜形成をみせず, 崩壊と皇胞化を示してゐた。 $4x \times 2x$ の交配にあつては, 2粒の胚珠で胚がみられた。1粒は "walking stick" 型 (YO) と他の1粒は "flat top" 型 (YT) であつた。"walking stick" 型の胚の胚乳は正常に発達してゐたが, "flat top" 型のものでは胚乳はなく, 種皮は萎縮してゐた。その他の胚珠には胚も胚乳もなかつた。

培地にカゼイン分解物と添加した子房の培養では, $2x \times 2x$ の場合には球型と "torpedo" 型の胚がみられた。ChO と ChG の培養区にあつては, 良く発達した胚がみられ, 胚乳の発達は自然条件下での交配後18日から21日目の発達程度に相当するものであつた。胚の発達

が少し遅れたものでは、胚乳の膜形成が胚の周辺部の8割程度にみられた。この状態は、Brassica ではふつう "heart" 型に分化すると胚乳の膜形成が始まるので、これに比べれば少し遅れてゐることが分つた。ChI と ChT の区別としては、球型の胚を持つ胚珠では "basal part" 以外の胚乳は全面に膜形成をしてゐた（図9d）

4x x 4x にあける胚には "heart" 型から "late torpedo" 型までみられ、ChC と ChT の区別はよく良好な発達を示した。胚の発達の遅れてゐるものでは、胚乳の異常発達が認められた。自然条件下では 2x x 4x の胚乳崩壊は交配後12日から始まる（図6b）が、ここでは胚乳の崩壊が "basal part"（図9l）のみならず他の部分にも観察された（図9m）。胚珠の発達がよいにも拘らず、胚の発達は初期の段階で止まつてゐるものもあった。膜形成を起こさな胚乳が僅かに胚周辺だけに存在して、"basal part" の胚乳の発達も悪く、胚嚢の内部が空になつてしまつてゐる、球型胚を持つ胚珠がみ

られた(図6m)。

2x x 4x の交配においては、胚の発達は球型から "flat top" 型までみられた。これらの胚珠の胚乳は膜形成と起こしては、著しく崩壊を示した。巨大核の出現、染色頂部分の偏在が胚乳の多くの部分において観察された(図90)。更に崩壊の進んだ胚乳もみられ、胚はくずれ、その周りの胚乳はヘミトキシリンで染色されず、核も細胞質も区別がつかなくなつてゐる胚珠もあった。胚乳が膜形成と起こしたものは、全く存在しなかった。

4x x 2x の交配においては、"torpedo" 型の胚が直ちに細胞分裂を行つてゐたが、分化が遅れてゐるものもみられた(図6p)。
"torpedo" 型の胚を持つ胚珠の胚乳は "basal part" 以外の總この部分において膜形成と起こしてゐた。

"heart" 型や球型胚を持つ胚珠には胚乳は存在せず、種皮は著しく萎縮してゐた。胚嚢に接した内皮細胞の肥大が起こり、これらの細胞が胚を圧迫してゐる胚珠がみられた(図6q)。

著本培地はココナツトミルクと生乳調製物
 類と添加した培地で人工培養をした多房のう
 ち、 $2x \times 2x$ においては、胚の発達は IAA と添
 加した培地で球型胚がみられた (CHI) 他は、い
 ずれの区においても胚の発達が良く "torpedo"
 型から "upturned U" 型まで観察された。そして
 どれも良好な発達を示す胚珠の胚乳は全面に
 膜形成を起してゐた。また球型の胚を持つ
 胚珠の胚乳も図 6a のように全面に膜形成を
 示した。発達の良好な "torpedo" 型ととも胚珠の
 内には、胚乳の発達が悪く種皮が萎縮して図
 6a のようになつてゐるものもあった。 $4x \times 4x$
 の交配では、CMC の区で良く発達した胚がみら
 れたが、他の培養区では球型から "torpedo" 型
 までであった。この球型胚ととも胚珠の胚乳
 では全面にわたって膜形成がみられ、図 6a
 の如き様子を呈してゐた。

$2x \times 4x$ の胚の発達は、一般に余り良くなく、
 多くは "late heart" 型の段階に達したものがみ
 られた。胚乳の崩壊に伴つて球型胚の崩壊が

図6x のように観察された。このような胚珠の胚乳は著しい皇胎化を示したり(図6r), 大小さまざまな核だけが集まったりするものがみられた(図6s)。"heart"型胚の周辺部の胚乳には, 多数の非常に巨大な核が図6j のように存在した。胚乳における膜形成ほどの胚珠にもみられなかった。 $4x \times 2x$ については, 総て22個の胚珠を調査したが, 胚・胚乳は全く存在せず, 種皮を著しく萎縮してゐた。

基本培地にココナットミルク, カゼイン酸分解物および生長調整物質(IAA, GA, Kinetin)を添加したものに子房を人工培養した。 $2x \times 2x$ の場合, 胚の発達程度は球型から"walking stick"型までであった。これら"walking stick"型と"torpedo"型の胚をもつ胚珠では, 胚乳は膜形成を起してあり, 自然条件下での発達と同程度であった。また球型胚と接する胚珠においても, その胚乳は全周にわたって膜形成を示してゐた(図6t)。 $4x \times 4x$ の発達球型から"walking stick"型までみられたが, $2x \times 2x$ に較

べで一段と良いものがあった。子葉部の形成した胚が、胚座の良い胚の中に見られた (CMChK) (図6u)。球型胚を持つ胚珠でも胚乳の膜形成がCMChIとCMChT足にありと見られた (図6t)。胚乳核の異常、即ち皇胞化、巨大核の出現、核の崩壊等は認められなかった。

$2x \times 4x$ の胚発座は球型から "heart" 型までであった。それ等の胚珠では胚乳の膜形成がなかったと認められなかった。そして種々の異常が観察された。即ち胚乳の崩壊 (図6v) や、巨大核や多くの異常皇胞の出現 (図6w) 等である。胚周辺の胚乳の崩壊が胚の崩壊を引き起こしてゐるものも観察された (図6x)。

$4x \times 2x$ には、12個の胚珠を調査したが総ての足にありと胚珠は萎縮してしまつてゐた。球型胚を持つ胚珠にもありとも胚乳は存在せず、胚珠は萎縮してゐた。そして種々は図6g のように胚を押しつけてゐた。

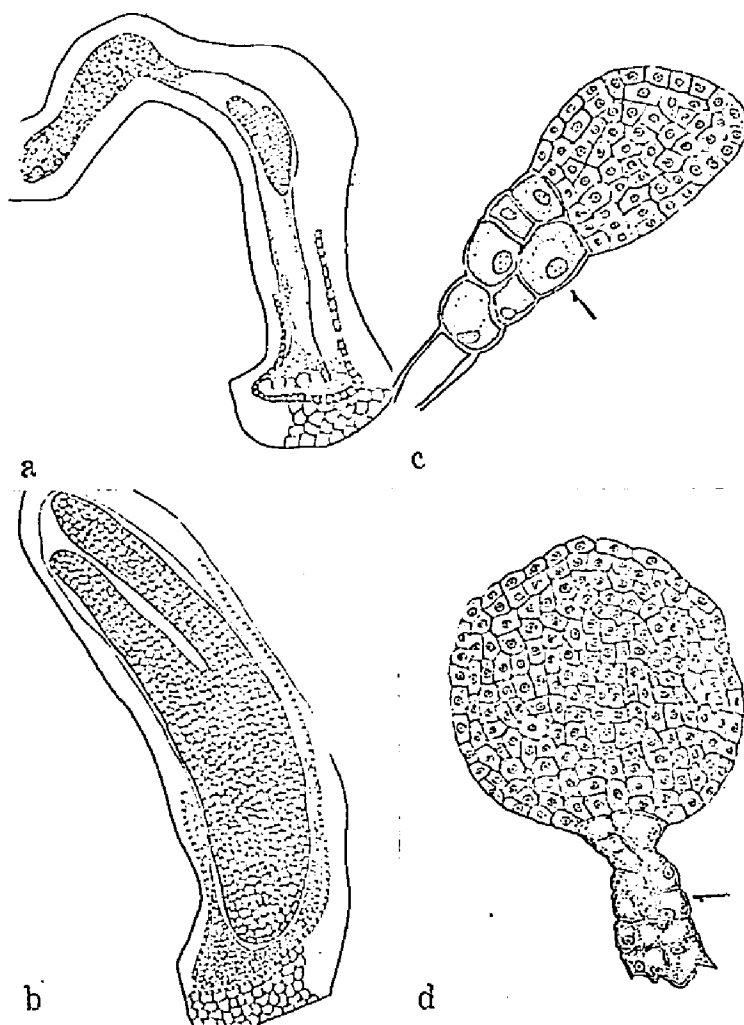
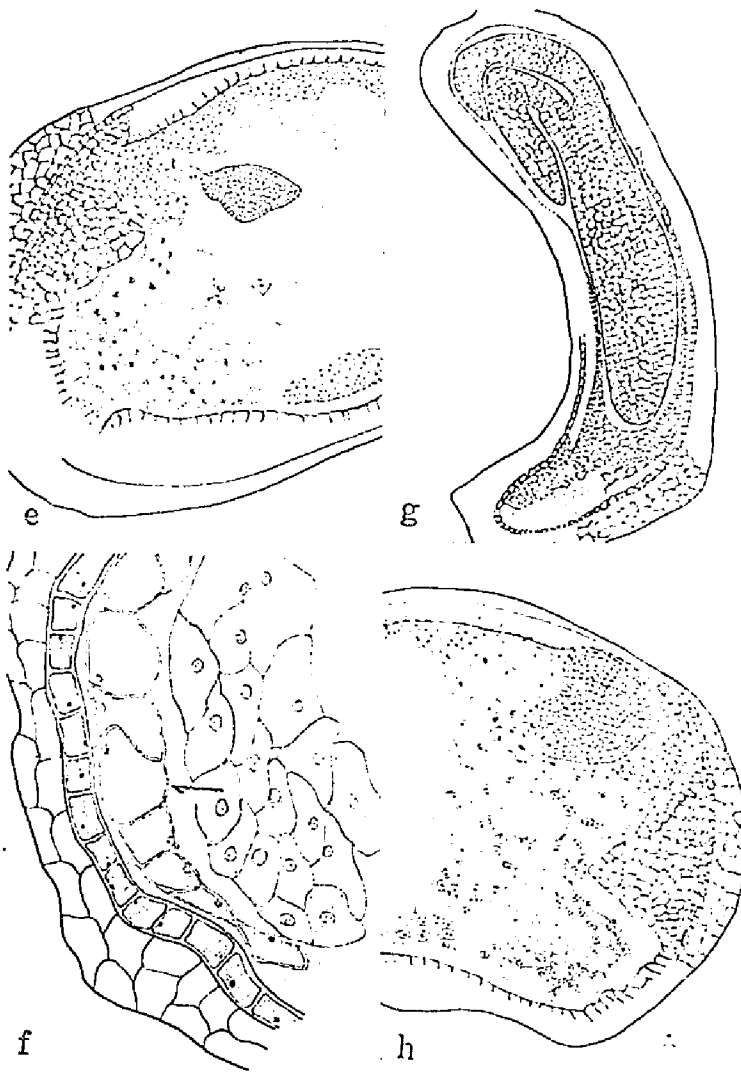


Fig. 6. Embryo and endosperm development in cultured ovaries.

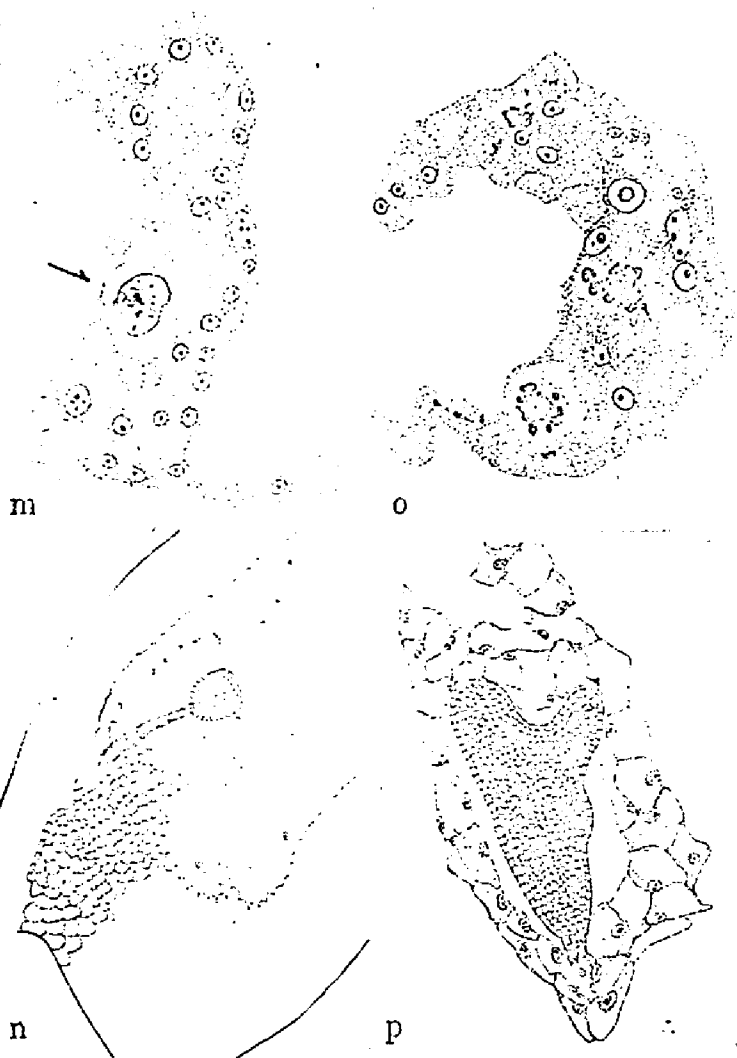
- a: $2\times \times 2\times$, early torpedo shaped embryo and poor cell walled endosperm.
- b: $4\times \times 4\times$, late torpedo shaped embryo and shrivelled seed coat.
- c: $4\times \times 2\times$, anomalous suspensor (arrow).
- d: undifferentiated embryo and anomalous suspensor in ovule culture (arrow).



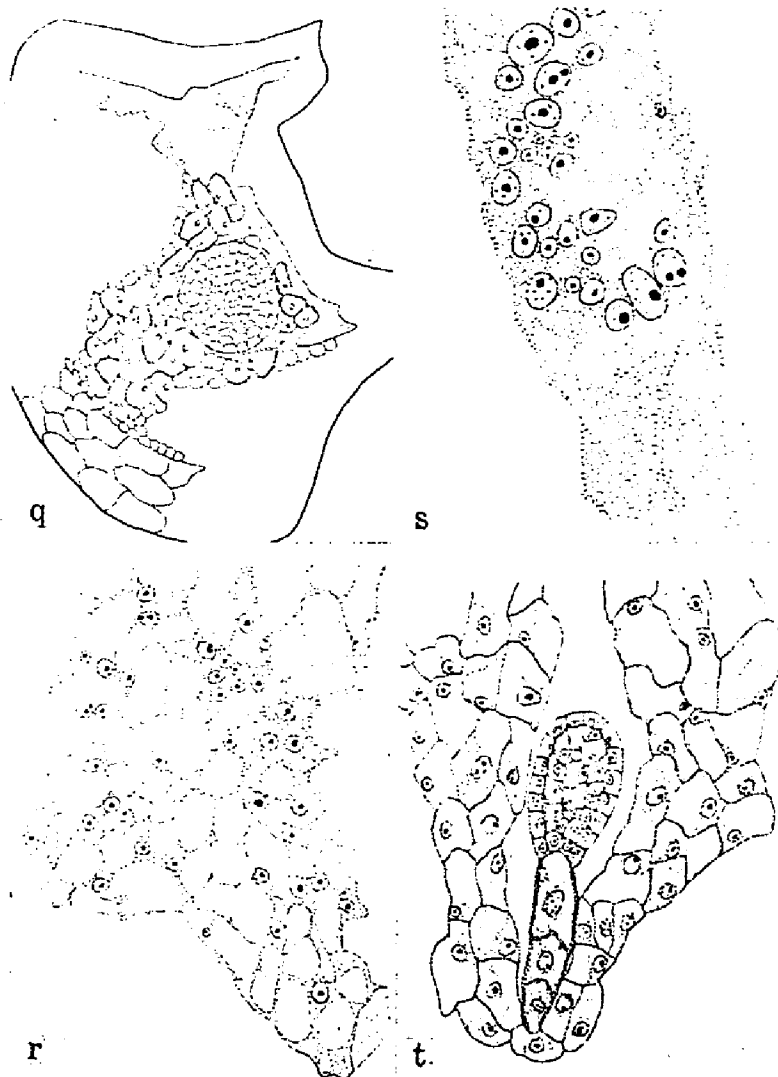
- e: $4x \times 2x$, anomalous embryo and poor developed endosperm.
 f: $2x \times 2x$, enlargement of the nucellus cells (arrow).
 g: $4x \times 4x$, late torpedo shaped embryo and poor cell walled endosperm.
 h: $4x \times 4x$, heart shaped embryo and abnormal vacuolized endosperm.



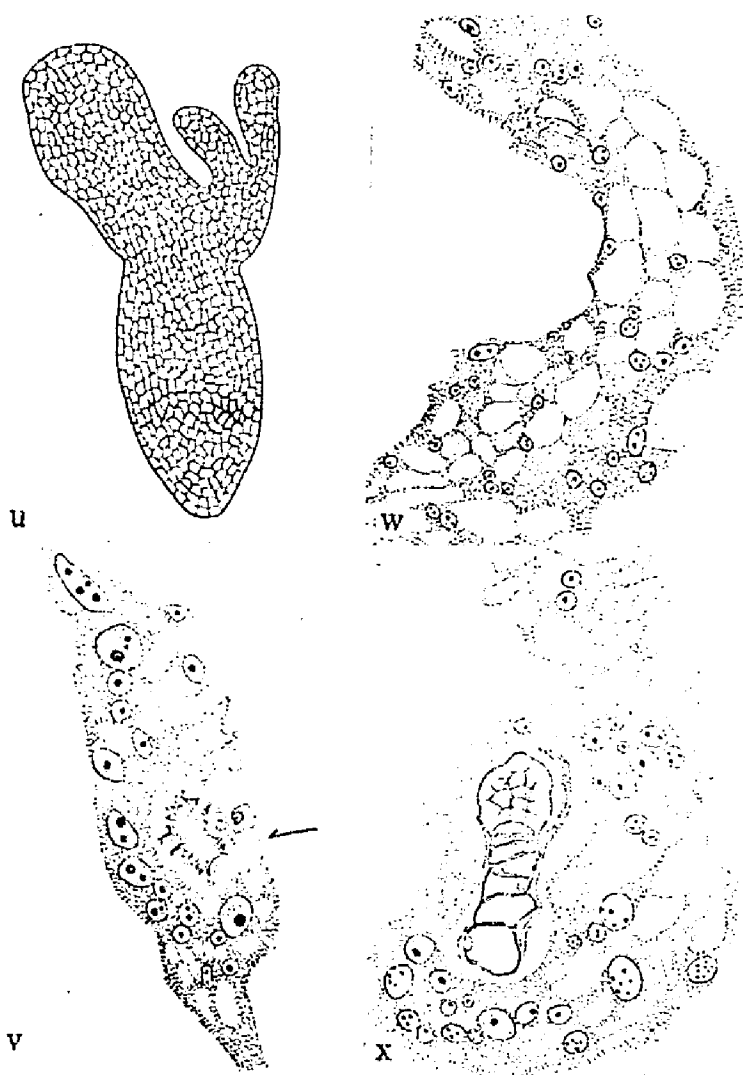
- i: $2\times \times 2\times$, no differentiated growing embryo and no cell walled endosperm.
- j: $2\times \times 4\times$, abnormal endosperm and irregular sized nuclei.
- k: $2\times \times 4\times$, endosperm collapse (arrow) near the embryo in natural condition.
- l: $4\times \times 4\times$, endosperm collapse (arrow) at the chalazal part.



- m: $4x \times 4x$, endosperm collapse (arrow).
 n: $4x \times 4x$, poor no cell walled endosperm and globular shaped embryo.
 o: $2x \times 4x$, giant nucleus and collapsed endosperm.
 p: $4x \times 2x$, embryo differentiation was retarded.



- q: $4x \times 2x$, giant nucellus cells and globular embryo.
 r: $2x \times 4x$, abnormal vacuolization in endosperm remarkably.
 s: $2x \times 4x$, numerous nuclei congregated at either side of endosperm.
 t: $2x \times 2x$, globular shaped embryo and cell walled endosperm.



- u: $4\times \times 4\times$, embryo deformed at the cotyledonous part.
 v: $2\times \times 4\times$, endosperm collapse (arrow) and many sized nuclei.
 w: $2\times \times 4\times$, conspicuous vacuolization in endosperm.
 x: $2\times \times 4\times$, degeneration of endosperm and collapse of embryo.

Table 22. Effect of growth substances and developmental condition of embryo in artificial culture of ovaries

Cross	Medium ¹⁾	Developmental stages of embryo							
		Not existed	Globular	Heart	Early torpedo	Torpedo	Late torpedo	Walking stick	Upturned U
2x x 2x	O	2	2	0	0	6	0	1	0
	IAA	5	5	0	0	1	2	0	0
	K	4	0	0	0	5	0	2	0
	GA	1	0	0	2	3	1	1	2
	T	6	1	0	1	2	0	0	0
Total		18	8	0	3	17	3	4	2
2x x 4x	O	7	4	2	0	0	0	0	0
	IAA	17	2	0	0	0	0	0	0
	K	9	7	1	1	0	0	0	0
	GA	8	3	0	0	0	0	0	0
	T	12	1	1	0	0	0	0	0
Total		53	17	4	1	0	0	0	0
4x x 4x	O	2	1	0	1	4	6	1	0
	IAA	11	4	2	1	0	0	0	0
	K	7	0	0	2	4	1	0	0
	GA	2	0	2	0	4	2	0	0
	T	5	6	2	1	6	0	0	0
Total		27	11	6	5	18	9	1	0
4x x 2x	O	13	1	0	0	1	0	1	0
	IAA	21	0	0	0	1	0	0	0
	K	23	1	1	0	0	1	0	0
	GA	16	2	2	0	0	0	0	0
	T	20	1	0	1	0	0	0	0
Total		93	5	3	1	2	1	1	0

1): Refer to Table 15.

Table 23. Effect of different nutrients and developmental condition of embryo in artificial culture of ovaries

Cross	Medium ¹⁾	Developmental stages of embryo							
		Not existed	Globular	Heart	Early torpedo	Torpedo	Late torpedo	Walking stick	Upturned ^u
2x x 2x	N	8	2	0	0	2	1	0	0
	TJ	9	0	0	1	0	0	0	0
	YE	0	1	0	1	7	2	0	0
	Ch	1	3	0	0	3	0	0	0
	CM	0	1	0	0	3	0	3	2
	CMCh	0	1	0	1	2	0	1	0
	Total	18	8	0	3	17	3	4	2
2x x 4x	N	8	2	0	0	0	0	0	0
	TJ	12	0	0	0	0	0	0	0
	YE	11	1	0	0	0	0	0	0
	Ch	4	4	1	0	0	0	0	0
	CM	13	4	2	1	0	0	0	0
	CMCh	5	6	1	0	0	0	0	0
	Total	53	17	4	1	0	0	0	0
4x x 4x	N	7	1	3	0	2	2	0	0
	TJ	7	2	0	1	0	0	0	0
	YE	3	2	2	2	2	0	0	0
	Ch	3	2	0	1	7	2	0	0
	CM	7	1	0	0	2	1	0	0
	CMCh	0	3	1	1	5	4	1	0
	Total	27	11	6	5	18	9	1	0
4x x 2x	N	25	3	0	0	0	0	0	0
	TJ	15	0	0	0	0	0	0	0
	YE	19	0	0	1	0	0	1	0
	Ch	1	1	3	0	2	1	0	0
	CM	22	0	0	0	0	0	0	0
	CMCh	11	1	0	0	0	0	0	0
	Total	93	5	3	1	2	1	1	0

1): Refer to Table 15.

胚の生育における生長調整物質と栄養物の関連について

各組合せにおける胚の生育については、生長調整物質と栄養物質の関連を調査した結果のうち、生長調整物質については表22に、栄養物質については表23にそれぞれ示した。

生長調整物質については、 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の胚の発達状態をみると、胚球中には胚の存在しなかったものの数が一番多かったが、次は "torpedo" 型の胚であった。"torpedo" 型以上に発達した胚をみると、 $2x \times 2x$ では基本培地のみ(0)で7粒、カイネチン(K)とジベレリン(GA)で同じ7個であった。 $4x \times 4x$ では、基本培地で11個であるのに対し、生長調整物質を添加したものは6個(T, GA)が最も多かった。

$2x \times 4x$ についてはみると、胚の発達は早く、IAAを含む培地で "early torpedo" 型と示すのみであり、 $4x \times 2x$ では、"torpedo" 型以上に発達した胚は IAA で1個、カイネチンの区で1個

得られずが、主要調節物質を含むものは2粒で最も良かった(表22)。

基本培地には添加した栄養物について243の"torpedo"型以上は発達した胚は、 $2x \times 2x$ で、^{第1}養物を含まないもの23個に対して、イースト抽出物を含む培地(YE)で9個、ココナツミルクを含む培地(OM)で8個、ココナツミルクとカゼイン酸分解物の両者を添加した培地(OMCh)で3個あった。特にOMとOMChでは何なる発達をみた胚かみとめられた。 $4x \times 4x$ では、栄養物を添加したもの培地で4個に対して、カゼイン酸分解物を添加した区(Ch)で9個、ココナツミルク添加培地で3個、OMChの培地からは10個得られた。いずれにおいても胚の発達は添加した栄養物によって大きく差がみられた。 $2x \times 4x$ では最もよく発達した胚は、OMの培地で、"early torpedo"型の胚2個あったが、 $4x \times 2x$ ではYEとChの区において良好に発達した胚とモツ胚珠が得られた。

トマトジュースを培地には添加した区において

は、11 ずいの交配組合せから生まれた胚の発達を認める胚珠はみられず、 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ にはそれぞれ各 1 個の "early torpedo" 型の胚とみられるのみであった (表 25)。

胚珠の中に胚が消失してしまつて存在しないものの数が一番多くみられたが、 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ では、次に多い胚の発達段階は "torpedo" 型のものであった。子房の人工培養を行なうと、胚の発達が良好に進行するものは、割合順調に "torpedo" 型まで発達するが、そうではないものは置床したときからほとんど発達しないように思われた。

子房培養と自然条件下での胚の発達の比較

自然条件下での胚の発達と人工培養した子房でのそれとを比較した。11 ずいの交配組合せにおいても、成熟すれば生育可能な種子とつくとと思われる胚が観察された (図 7)。

自然条件下での胚の発達程度は、発達段階を追

して調査したものである (Nishiyama and Inomata
 1966)。人工培養の場合は、交配後4日目の植
 物体から切り離した子房を無菌的に種々の培
 地に培養し、11日を経過した時発育状態を観
 察したものである。これらの胚・胚乳はいずれ
 も同じ倍率で、カメラ・ルミダを用いてスレ
 ックした。図9からも明らかのように、自然
 条件下で生育出来る種子になるとみられる胚
 珠を観察された胚に比べ、人工培養子房にめ
 られた胚は、交配後15日目の段階において、
 2、3日から7日程生育が良いことが分かつ
 た。即ち交配後15日目における胚が自然条件
 下の18日或は21日目の胚と同程度の発達と認
 めた。この胚の発達状態の差は、用いた培
 地や、交配組合せに関係なく、同じであった
 生育可能な種子になると思われる発育段階に
 達していった胚では、胚乳の発達が十分でな
 く、種皮もほとんど萎縮してしまっていた。

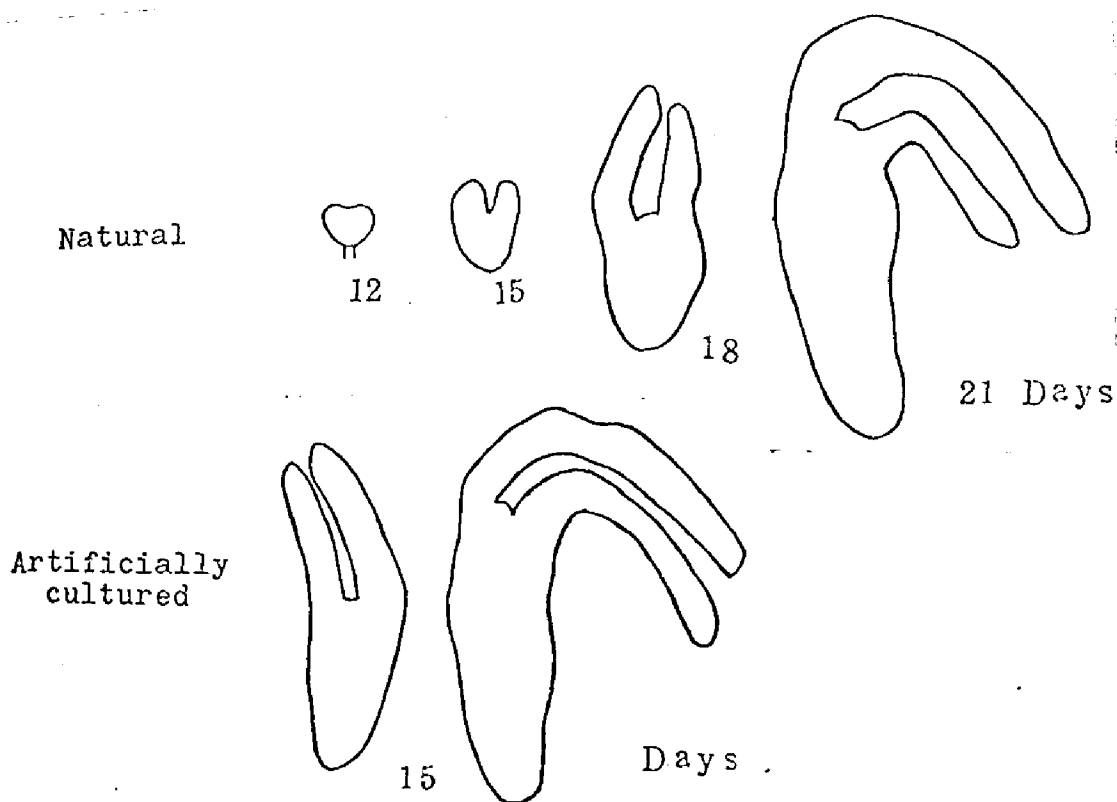


Fig. 7. Development of embryos under natural and artificially cultured condition.

(2) 器官の人工培養による雑種化の育成

(i) 自然状態による交雑結果

胚珠および子房の人工培養を行なったときは、その各々の組合せに対し、対照実験でもうけた。これは、交配を行なったからそのとき放置して植物体に着いていきま、自然条件下で胚珠の発達をさせ、交配後40日後において収穫し調査したものである。

結 果

対照として自然条件下における交雑結果を調べた。成熟した莢について、莢の長さ、種子数、得られし種子の発芽率等を調査し結果を表24に示す。表24中NO.1は胚珠培養を行なったときの対照のものであり、NO.2は子房の人工培養を行なったときのそれであり、NO.3とNO.4はそれぞれ修正培養による子房の人工培養の対照実験である(参考、(2) iv)

Table 24. Results of crossing experiment between diploid *B. campestris* (2x) and its autotetraploid (4x) under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
N o . 1 *					
2x x 2x	24	26.9	62	12.9	85.5
2x x 4x	5	36.0	0	0.0	-
4x x 4x	23	40.0	95	17.2	94.7
4x x 2x	5	40.5	0	0.0	-
N o . 2 * *					
2x x 2x	37	29.5	126	18.8	92.0
2x x 4x	12	32.0	0	0.0	-
4x x 4x	70	52.1	359	20.3	95.1
4x x 2x	13	37.8	0	0.0	-
N o . 3 * *					
2x x 2x	11	34.4	25	11.4	100
2x x 4x	12	20.9	0	0.0	-
4x x 4x	8	36.9	23	12.0	100
4x x 2x	10	41.5	0	0.0	-
N o . 4 * *					
2x x 2x	7	65.3	115	72.8	90.4
2x x 4x	9	57.7	0	0.0	-
4x x 4x	9	58.3	47	22.0	63.8
4x x 2x	8	63.0	0	0.0	-

* : Ovule culture.

** : Ovary culture.

実験に使用した2倍体はNO.1からNO.4まで
=貧目体菜であり、同類4倍体はどれも、
4-フ白菜である。

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ では、NO.4の $2x \times 2x$ の場合
と除いていずれも、菜の長さが短く、種子の
稔性も低かった。これは他殖性作物の Brassic
を自殖したためと考えられる。またNO.4の
 $2x \times 2x$ の場合は、種子と直接種子業者から得
めたものであったので、種子稔性は他のものと
較べて非常に高く、通常実験に用いたものが
10%から20%前後の種子稔性であったものが、
72.8%であった。しかしながら、得られた
種子の発芽率は $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ では、NO.4の
 $4x \times 4x$ と除いて、いずれも85%以上を示し
た。種子稔性は胎座数 ($2x \times 2x$ は20, $4x \times 4x$
は24) と得られた種子数から計算した。 $2x$ と
 $4x$ 間の正逆交雑において、多数の胚珠は
かに発達したと思われたが、種子は幼胚の
期に崩壊してしまい、交雑種子はいずれの
場合においても得られなかった(表24)。

子房の人工培養による新型ナブスの育成の研究を行なったが、この時に種之間に交配組合せの対照実験区として、いずれの場合においても交配後植物から離さずに放置して、収穫まで待ち、葉の大きさ、得られた種子数、発芽率、その種子の発芽率等が調査された。その結果を表 25-1 と表 25-2 に示す（表 25-1, 25-2）。

B. campestris 群としては、畑菜、野崎白菜、金町小燕、京都白菜、早生小松菜とニ食自体菜を用いて、B. oleracea 群のサクセツシヨニ、中野早生と野崎中世の交配を行なったもので、正逆交雑の他に対照区の交配も行なった。実験区 NO. 1 においては、サクセツシヨニとネオに用いた交配の結果は調査しなかった。対照実験の交配結果をみると、種子稔性は組合せによってかなり異なっており、最も低いもので 2.1%、最高 93.8% であった。得られた種子の発芽率は、早生小松菜の自殖を除いていずれも 80~100% を示した。キヤベツのネの

Table 25-1. Results of crossing experiment between campestris and B. oleracea under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
N o . 1 Hatana and Succession					
Hatana x Hatana	7	43.1	36	13.4	97.2
Hatana x Succession	15	61.4	0	0.0	-
Succession x Succession	0	-	-	-	-
Succession x Hatana	0	-	-	-	-
N o . 2 Nozaki-hakusai and Nakano-wase					
Nozaki x Nozaki	7	20.6	3	2.1	100
Nozaki x Nakano	7	32.3	0	0.0	-
Nakano x Nakano	6	91.6	0	0.0	-
Nakano x Nozaki	7	88.0	0	0.0	-
N o . 3 Kanemachi-kokabu and Nakano-wase					
Kabu x Kabu	9	46.2	45	17.7	97.8
Kabu x Nakano	30	23.5	0	0.0	-
Nakano x Nakano	5	110.0	71	47.3	83.1
Nakano x Kabu	8	84.4	0	0.0	-

Table 25-2. Results of crossing experiment between B. campestris and B. oleracea under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
No. 4 Kyoto-hakusai and Nakano-wase					
Hakusai x Hakusai	4	78.3	105	93.8	82.8
Hakusai x Nakano	13	12.2	0	0.0	-
Nakano x Nakano	3	123.3	71	78.9	100
Nakano x Hakusai	16	104.8	0	0.0	-
No. 5 Wase-komatsuna and Nozaki-chusei					
Komatsuna x Komatsuna	4	74.5	92	82.1	8.9
Komatsuna x Nozaki	5	64.8	0	0.0	-
Nozaki x Nozaki	25	84.8	110	14.7	98.2
Nozaki x Komatsuna	18	66.2	0	0.0	-
No. 6 Nikanme-taina and Succession					
Taina x Taina	6	27.5	20	16.7	100
Taina x Succession	3	21.0	0	0.0	-
Succession x Succession	6	85.0	146	81.1	100
Succession x Taina	27	87.1	0	0.0	-

自殖では種子の得られないうちのものもあった。收穫時にはおいて求めた平均の莢の長さは、B. campestris 群と母オに用いた組合せのオは、B. oleracea 群と母オにしたものよりも短く、 $\frac{1}{4}$ から $\frac{1}{5}$ の長さであった。正逆交雑においては、莢の長さは対照区のものと同程度に発達したものが多かったが、これ等の莢の中には発達初期には胚乳生が行なわれたと思われる、そしてやがて止ってしまつた萎縮した胚珠が存在したのみで、発達の良い種子はどの組合せの交配からも得ることは出来なかつた。

(ii) 胚 培 養

Brassica においては、胚培養の研究は余りないが、Brassica における種間交雑ではそのほとんどが不稔になる。しかもこれ等の雑種を容易に作成することは、育種上重要であると知られている。B. oleracea と B. campestris との正逆交雑のうち B. oleracea x B. campestris では

幼胚を取り出しで培養することに成功した。その組合せでは胚が発達初期に崩壊してしまふので、胚培養によつて雑種は得られなかつた (Nishi et al. 1959)。B. campestris の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交雑においても、通常種子は得られなかつた。胚発生学的な研究によると、この場合の種子崩壊は主として胚乳崩壊に起因することゝ分かった (Nishiyama and Inomata 1966)。

この事実に基づいて B. campestris の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交雑においても、その胚崩壊以前に無菌的に胚を取り出しで人工培養することゝ試みた。その結果を以下に述べる。

方 法

上述の組織学的ならびに発生学的研究の結果に基づいて、培養のために胚珠から胚を取り出す最も適切な時期と決定した。即ち $4x \times 2x$ にあつては交配後 12 日目、 $2x \times 4x$ にあつては交配後 13 日目に胚を胚珠から無菌的に摘出

した。この際、植物体から切り取った莖の表面を80%エチルアルコールで殺菌し、予め用意しておいた培養基中に約1mm沈ませで置床した。胚の摘出方法は Van Overbeek et al. (1942) によった。置床した胚は $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 1000 ルックスの恒温箱中で培養した。約2週間後には不定形の子葉の著しい発達が認められた個体は作用物質とまったく含まない修正 white の培地に移し替え、発根とともに本葉の転回が始まって、3-4枚になったとき、試験管から植物体を取り出して、石英砂に移植し、 20°C の恒温室で栽培した。そしてさらに3週間経過してから土と入れた鉢に移した。これらの植物の雑種性の検定にあたっては、形態的調査を行なうとともに、染色体数とPMCの成熟分裂で調べた。

胚培養に用いた基本培地は表26に示す white の修正培地である(表26)。この基本培地は Lupinus luteus から抽出された "embryo factor" を加え pH 6.0 に調整し、 $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$ の高压滅菌を

Table 26. Composition of a modified White's medium used for the embryo culture (mg/l)

MgSO ₄ · 7H ₂ O	36.12
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	197.2
Na ₂ SO ₃	199.6
KNO ₃	80.0
KCl	67.2
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	14.4
MnSO ₄ · 7H ₂ O	4.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.52
H ₃ BO ₃	1.44
KI	0.75
Ferric citrate FeC ₆ O ₅ H · 5H ₂ O	4.0
Glucose	4000
Agar	900

10分間行なう。

用いた "embryo

factor" は Lupinus

luteus の若い未

熟の種子から 2℃

の 80% エタノール

で抽出し、濾

化後溶解液を蒸

発させたもので

ある。蒸発の過

程では 50℃ 以上

に温度を上昇さ

せなかった。全

体重 100g に相当

する Lupinus の種子の抽出物を 10ml の水に溶解

し、氷結した状態で保存した。胚培養に使用

した濃度は、Lupinus の生体種子 10g の抽出物

を 100CC の培養基に加えたものに相当する。

即ち培養基 100CC に対し、アルコールで抽

出したのを水に溶解させた抽出液を 1CC の割

合に添加した (Matsubara 1962, 1964)。

結 果

実験の結果を表27に示す(表27)。

Table 27. Production of triploid hybrids between *B. campestris* (2x) and its autotetraploid (4x), with or without embryo culture

Cross	Embryo culture	No. of flowers pollinated	No. of embryos fertilized	No. of embryos explanted	No. of triploids produced
2x x 4x	no	125	375	-	0
"	do	14	-	4	1
4x x 2x	no	207	1656	-	35
"	do	18	-	20	2

* estimated on the basis of 8 and 3 embryos per flower in diploid and tetraploid, respectively.

2x x 4x につゝは 125 花交配し、約 400 個の胚珠に受精を認めたが、雑種種子は得られなかった。一方胚培養に関しは、受精した 14 花から 4 個の胚を摘出し、培養した。4 個の胚のうち 2 個が生育したのど、"embryo factor" を除いた white の基本培地に移植した。その後

1個は胚の頂点が緑色を帯びたとこそ生育が止まってしまつたが、他方は不規則ながら子葉部の成長を示した。約1ヶ月後に再び white の培地に移すと、旺盛な葉根と根の伸長を示し、同時に本葉の展開を始めた(四ケ)。

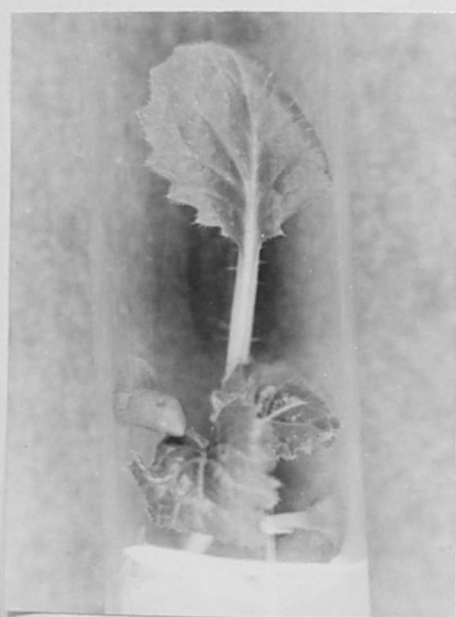


Fig. 7. Hybrid plant obtained from embryo culture in test tube.

得られた雑種個体と両親の葉の形態および植物体全体を表28および図8に比較して示す。 $2x \times 4x$ からの雑種個体の葉の先端は丸く、2倍体の形質に、葉の厚さは $4x$ 型、葉の表面は $2x$ 型の形質に近かつた。

$4x \times 2x$ については、207

花を交配し、約1600粒の受精胚珠を認めた。それから計35粒の種子を得たが、これから生じた植物はすべて雑種であつた。一オ胚培養に關しては、18花を授粉し、それから20個の胚を摘出して培養した。そのうち3個体の胚

から不足の子葉の生長を認めたので、これを White の無機塩だけの培地に植え替えたところ、 $2x \times 4x$ と同じ時期に発根と本葉の展開がみられた (図 7)。この 3 個体とその後植本鉢に移植したが、うち 1 個体は枯死し、残りの 2 個体が生育したので、両親および $2x \times 4x$ の個体と形態的に比較した (表 28, 図 8)。葉の先端は丸く、厚さは厚く $4x$ 親型と示し、葉形は滑か $2x$ 親型と示して 11 下。両個体とも、 $2x \times 4x$ から得られた個体と類似して 11 下。

$2x \times 4x$ および $4x \times 2x$ から得た 3 個体は染色体観察の結果、いずれも 3 倍性雑種であることが確認された。

Table 28. Morphology of leaves of the hybrid plants obtained from embryo culture

Plant	Shape of leaf tip	Leaf thickness		Leaf surface		Ploidy
	Notched Round	Thick	Thin	Rough	Smooth	
$2x \times 2x$	*		*		*	$2x$
$4x \times 4x$	*	*		*		$4x$
$2x \times 4x$	*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$	*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$	*	*			*	$3x$



Fig. 8. Hybrid plants obtained from embryo culture.
 a: Diploid Brassica campestris ssp. chinensis (L.) Makino.
 b: Autotetraploid B. campestris ssp. pekinensis (Lour.) Olsson.
 c: F_1 hybrid from $2x \times 4x$.
 d. and e: F_1 hybrid from $4x \times 2x$.

(iii) 胚珠の人工培養

倍數性の異なる交雑、或は種属間雜種の不稔種子形成と、発生学的な研究からみると、胚の発達が停止するのは、胚自体の生理的、遺伝的な不均衡からの場合もあるが、直接的には胚乳の異常にともなう不稔から、種子不稔を引き起こしてゐると思われるものが多く存在してゐる。交配した胚珠の発達が止み、胚乳の崩壊が起こって、胚の崩壊消失以前に胚を胚珠から取り出して、胚培養を行なう他に交雑不適合の組合せから、雜種個体を得る研究として、胚・胚乳と胚珠の関係を明らかにする研究が必要と思われた。

ここでは交雑不適合個体の胚珠の人工培養を種々の培地を用いて試みた。

交配後9日目の胚珠と人工培養に用いた。

これは前述の発生学的観察によつて、この時期までは $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の胚の発達程度は両親と変わりかなく、胚乳も著しい崩壊を示してないからである。

培養に用いた基本培地は Nitsch (1951) のもので、その無機塩および微量元素と鉄の添加は

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500mg
KNO_3	125mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125mg
KH_2PO_4	125mg

次の通りで

ある。(1),

(2), (3)

を各々1ℓ

H_2SO_4 sp. gr. 1.83	0.5cc
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3000mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500mg
H_3BO_3	500mg
$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	125mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25mg

の純水に溶

解し、(2)

液と(3)

液とを各々

各々1ccずつ

取つて(

$\text{FeC}_6\text{O}_5\text{H} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10g ----- (3) 1) 液に混

合したものである。その他に基本培地に添加

したものは、グリシン 15mg, ナイアシン 2.5mg,

ピリドキシン 0.5mg , サイアミン 0.5mg , 蔗糖 5g , 琼脂末 9g (いずれも 1L あたり) である。培養基の pH は 1N-KOH 或いは 1N-HCl で高圧殺菌前には 6.0 に調整した。高圧殺菌は 1.2 kg/cm^2 で 10 分間行なった。培養に用いた試験管は $18 \times 180\text{ mm}$ のもので、その中には 10ml の培地を入れた。

この基本培地には、さらに、IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジュース (15% と 25%), イースト抽出物 (2g/L) を必要に応じて添加した。IAA, カイネチン, ジベレリンの添加量は表 29 に示す (表 29)。

交配後 9 日目の子房を植物体から切り取ってすぐに 70% エタノールで表面を殺菌し、カミソリの刃で切り開いて胚珠と摘出した。これを予め用意した培地に置床した (図 9)。置床した胚珠の数は試験管 1 本当たり 4 個である。培養条件は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 蛍光灯で $300-500\text{ lx}$ の連続照明と行なった。

植えこんでから 31 日後 (交配後 40 日目) に

Table 29. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. ¹⁾
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

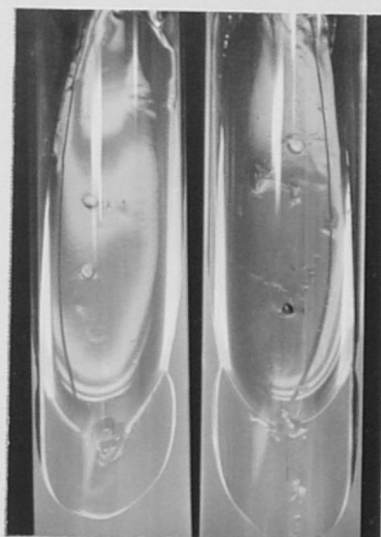


Fig. 9. Explanted ovules in test tubes.

胚珠の発達状

態を調べた。

また置床6日

後(交配後15

日目)に6~13個の胚珠を各皿から取り出し、胚珠の発達状態を組織学的に調べた。その結果はすでに述べたとおりである。

結

果

結果を表30にまとめて示す(表30)。表30

Table 30. Effects of IAA, kinetin, gibberellin, tomato juice and yeast extract on the growth of cultured ovules

Medium*	N o . o f o v u l e s			
	Cultured	Examined	Somewhat developed	Un-developed
K-1	54	48	19	27
K-2	47	38	21	17
K-3	43	33	17	16
K-4	44	36	17	19
K-5	48	35	18	17
K-6	44	38	21	17
K-7	44	35	20	15
K-8	44	36	25	11
K-9	42	33	25	8
G-1	59	51	17	34
G-2	47	39	14	25
G-3	47	37	20	17
G-4	45	34	26	8
G-5	44	31	25	6
G-6	44	32	21	11
G-7	43	32	21	11
G-8	39	28	20	8
G-9	38	30	22	8
T-1	80	70	39	31
T-2	55	48	28	20
T-3	58	47	31	16
Y-1	60	47	30	17

* K-1 to G-9: Refer to Table 29.

T-1: Basal medium (=K-1, G-1).

T-2 and T-3: Basal medium plus tomato juice 15% and 25% respectively.

Y-1: Basal medium plus yeast extract (2g/l).

にあり、各培養皿の培養された胚珠数は、4つの交配組合せ ($2x \times 2x$, $2x \times 4x$, $4x \times 4x$, $4x \times 2x$) とまとめたものであり、交配組合せによつて植ふとんだ胚珠の数が異なつてゐたが、これは受精率の違いによるものである。表30における $k-1$, $G-1$ と $T-1$ はそれぞれ基本培地だけを含む対照区である。

IAA とカイネチンと培地に添加してその相互作用を調査した結果、 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ においては幾分発達したと思われる胚珠が半数あるのはそれぞれ以上ある区がほとんどであったが、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ においては幾分発達したと思われる胚珠が全体の $1/3$ であった。IAA とカイネチンとの相互作用と胚珠の発達の関係については明らかな傾向がみられなかった。外見上は種皮の発達程度に関して、自然条件のものと同程度のものが認められたが、その胚珠の形は球形ではなく凹んでゐた。発芽可能な種子は必ず此の区からも得られなかった。

IAA とジベレリンの相互作用を調べてみる

と、全体的に $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の胚珠の発達は
 良い傾向がみられた。4組合せを総合してみると、
 ジベレリン無添加区 (G-1, G-2, G-3) より
 も添加区 (G-4 ~ G-9) の方が、胚珠の発達は
 良かった。これらの区においても外観上、自
 然条件下のものと同じ程度の発達を示す胚珠
 がみられたが、球形ではなく凹みをしてい
 る、発芽可能な種子はいずれの区からも得ら
 れなかった。

トマトジューズ (15%, 25%) とイースト抽出物
 (2g/l) の効果については、 $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ に
 おいて発達した胚珠が多数みられたが、対照
 区 (基本培地だけ) においても同じ傾向があ
 ったので、トマトジューズあるいはイースト抽
 出物が有効であったかどうか明らかでない。

以上のように、培養に種々の培地を用いた
 が、種々の生長調整物質やトマトジューズ、
 イースト抽出物等の添加物の胚珠の発達に対
 する効果は明らかでなかった。またオーキシン、
 カイネチン等を含む培地においても、胚

珠のカルス化は認められなかった。

(iv) 子房の人工培養

Datura の種間交雑を行なうと、或る組合せにおいて受精卵は2, 3回分裂するだけで退化してしまったり (Satina and Blakeslee 1935), 接合体が分裂せず胚乳が数回分裂するだけのものや、発達が遅れ胚乳の異常によつて球型の胚のときには胚珠の発達がとんでしまう (Sacht 1948)。このように胚発生の初期の胚嚢の崩壊が起こつて不稔になる場合は、胚培養を行なうことは困難である。 Brassica oleracea (Howard 1939) と Raphanus sativus (Nishiyama 1952a, b, Inomata 1970) の $2x$ と $4x$ の交配では、 $2x \times 4x$ では種子形成の異常によつて不稔になるが、 $4x \times 2x$ では雑種個体が出て来る。ところが同じ Brassica 属において B. campestris 種における $2x$ と $4x$ の交配では、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ のいずれの組合せでも不稔種子しか得られないし、また B. oleracea

と *B. campestris* の正逆交雑においても通常種子は得られな。このような不稔種子の発生学的研究を行なった (A-(1)-(i))。この不稔種子の胚培養を行なって雑種個体を得ることから来た (Inomata 1967, A-2-ii)。しかしながら、胚と胚乳と胚珠の関連においては、胚培養の研究では十分でなく、胚珠の人工培養を行なった。種子の培養皿をつくって雑種育成を試みましたが、雑種個体を得ることは出来なかった (A-(2)-(iii))。

ここでは更に雑種個体を得る目的で、子房の人工培養と種子の培地を用いて試みた。

方 法

本実験では子房の人工培養を試みた。培養には交配後4日目の子房を用いた。これは、 $2x \times 2x$, $2x \times 4x$, $4x \times 4x$, $4x \times 2x$ とともにこの時期の胚・胚乳の発達には大きな差異がみられることによるものである。

培養に用いた培地は胚珠培養のものと同じ Nitsch (1951) のもので、これに 1 l あたりグリシン 15mg, ナイアシン 2.5mg, ピリドキシン 0.5mg, サイアミン 0.5mg, 蔗糖 50g, 寒天 9g を添加して基本培地とした。この基本培地は IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジュース (15% と 25%), イースト抽出物 (2g/l), カゼイン酸分解物, ココナットミルクと種々の組合せで添加した。カイネチンとジベレリンを IAA と組み合わせで用いた。(その添加量と培地の略称を表31に示す(表31))。またトマトジュース (15%, 25%) とイースト抽出物 (2g/l) のそれぞれを単独に用いたものの他に, トマトジュース, イースト抽出物, カゼイン酸分解物, ココナットミルクと IAA, カイネチン, ジベレリンと組み合わせで添加した。それ等の添加量と培地の略称を表32に示す(表32)。

表32の結果から, カゼイン酸分解物とイースト抽出物の組合せ(表33), ココナットミルクとイースト抽出物の組合せ(表34), コ

Table 31. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. ¹⁾
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

コナットミル

クとカゼイン

酸分解物の組

み合わせ (表

35) をつくり

実験をおこな

った。更に培

地の改良を行

ないカゼイン

酸分解物とコ

コナットミル

クを組み合め

せた培地を作

成した。その培地の添加量と略称を表36に示

す (表36)。培地のpHは高圧殺菌前に 1N-HCl

で 1N-KOH で 6.0 に調整した。高圧殺菌は

1.2kg/cm² で10分間行なった。実験に用いた試

験管は 18 x 180mm のもので、その中に 10ml の培

地を入れ、綿栓を施した。

上述したように交配後4日目の子房を植物

Table 32. Composition of enriched media for culturing excised ovaries

	None	IAA	K	GA	T
BM	NO	NI	NK	NG	NT
BM-TJ	TJO	TJI	TJK	TJG	TJT
BM-YE	YEO	YEI	YEK	YEG	YET
BM-Ch	ChO	ChI	ChK	ChG	ChT
BM-CM	CMO	CMI	CMK	CMG	CMT
BM-CM-Ch	CMChO	CMChI	CMChK	CMChG	CMChT

IAA: 1mg/l, K: kinetin 0.1mg/l, GA: gibberellin 1mg/l, T: IAA+K+GA, BM: basal only, TJ: tomato juice (15%), YE: yeast extract (2g/l), Ch: casien hydrolysate (300mg/l), CM: coconut milk (10%), CMCh: casein hydrolysate+coconut milk.

Table 33. Composition of various-media supplemented with yeast extract and casein hydrolysate used for culturing ovaries

	Y e a s t e x t r a c t (g/l)			
	0	2	5	10
Casein hydroly- sate (mg/l)				
0	YEC- 1	YEC- 2	YEC- 3	YEC- 4
300	YEC- 5	YEC- 6	YEC- 7	YEC- 8
1000	YEC- 9	YEC-10	YEC-11	YEC-12
2000	YEC-13	YEC-14	YEC-15	YEC-16

体から切り取り、花弁の付いたものはそれを取り除いて、直ちに5%サラシ粉水に8~10分間浸して消毒し、それを滅菌水で4回丁寧に洗滌してから試験管当り1個の子房を斜面培地上に植之込んだ(図10)。培養は

Table 34. Composition of various media supplemented with yeast extract and coconut milk used for culturing ovaries

		C o c o n u t m i l k (%)			
		0	10	20	30
Yeast extract (g/l)	0	CMYE- 1	CMYE- 2	CMYE- 3	CMYE- 4
	2	CMYE- 5	CMYE- 6	CMYE- 7	CMYE- 8
	5	CMYE- 9	CMYE-10	CMYE-11	CMYE-12
	10	CMYE-13	CMYE-14	CMYE-15	CMYE-16

Table 35. Composition of various media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate used for culturing ovaries

		C o c o n u t m i l k (%)			
		0	10	20	30
Casein hydroly- sate (mg/l)	0	CMC- 1	CMC- 2	CMC- 3	CMC- 4
	300	CMC- 5	CMC- 6	CMC- 7	CMC- 8
	1000	CMC- 9	CMC-10	CMC-11	CMC-12
	2000	CMC-13	CMC-14	CMC-15	CMC-16

Table 36. Composition of various media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate used for culturing ovaries

		C o c o n u t m i l k (%)			
		0	10	15	20
Casein hydroly- sate (mg/l)	0	CMC- 1	CMC- 2	CMC- 3	CMC- 4
	300	CMC- 5	CMC- 6	CMC- 7	CMC- 8
	500	CMC- 9	CMC-10	CMC-11	CMC-12
	1000	CMC-13	CMC-14	CMC-15	CMC-16

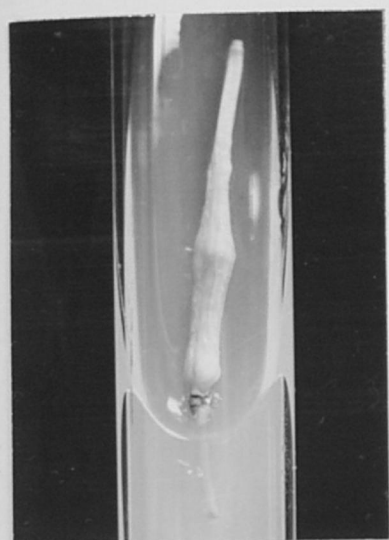


Fig. 10. Explanted ovary in test tube.

22±2℃ で 300-500 ルウスの
蛍光灯の連続照明下で行な
った。子房を植えこんでか
ら 36 日後 (交配後 40 日目)
に莖の長さ, 種子稔果率,
切り口のカルス形成等につ
いて調査した。

結 果

培養当初における子房の長さ

交配後 4 日目に植えこんだ子房の平均の大
きさを調査した。その結果を表 37 に示す (表
37)。表 37 のうち NO. 1 は, 実験方法の表 31,
32 と トマト ジュース (15%, 25%) と イースト
抽出物 (2g/l) を単独に添加したときの植え
こんだ子房の平均の大きさであり, NO. 2 は
実験の表 33, 34 と 35 のものであり, NO. 3 は
表 36 の実験区に植えこんだ, 交配後 4 日目の
子房の大きさである。NO. 1 と NO. 2 においては,

Table 37. Average length of explanted ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 1		
2x x 2x	32	10.7
2x x 4x	38	10.9
4x x 4x	35	13.7
4x x 2x	34	15.9
No. 2		
2x x 2x	34	10.1
2x x 4x	40	10.2
4x x 4x	34	11.6
4x x 2x	40	15.8
No. 3		
2x x 2x	20	20.8
2x x 4x	20	19.7
4x x 4x	20	17.4
4x x 2x	20	19.8

2x個体を♀親とし

た場合、4x個体を

♀親としたもののよ

りも、子房の長さ

は短かった。2x x

2x と 2x x 4x 2" は、

差がみられなかつ

たが、4x x 4x と

4x x 2x 2" は、後者

のオが長かった。

No. 3 の場合には

20個調査したが、

大きさはほとんど差

がなく 4x x 4x が一

番短かく、2x x 2x が一番長かった。

子房の人工培養

種々の植物生長調整物質又は栄養物質と添加した培地に子房を人工培養し、種子発性

切り口のカルス形成等について調べた。植え
こんど子房は各表に示すように、バクテリア
やカビの侵入がほとんどなかった。表32から
36までに示した培地については、実験を一度に
行なうことができなかったのど、表32は培養
物質を添加した培地組成により、6回に分け
て行なった。表33から表36までは各表の培地
とも No. 1 から No. 8 までと、No. 9 から No. 16 ま
でとに分けて行なった。

IAA とカイネチンの相互作用： IAA とカ
イネチンの相互作用を調査した結果を表38-1
と表38-2 に示す(表38-1, -2)。表38-1
は $2x \times 2x$ と $2x \times 4x$ の結果を示し、表38-2 は
 $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の結果を示した。植えこんど
子房の数と調査数が異なっているのは、胚珠
の発達中の状態を調査するため各2割1個の
子房を、交配後15日目に固定したためである。
收穫時の莢の長さや自然条件下で交配、発達

Table 38-1. Interacting effects of IAA and kinetin on cultured ovaries in 2x x 2x and 2x x 4x

Cross	Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	K-1	3	2	23.0	-	0	0.0	-
	K-2	3	2	21.5	-	1	2.5	0.0
	K-3	3	2	23.5	+	1	2.5	0.0
	K-4	3	1	14.0	-	0	0.0	0.0
	K-5	3	2	21.0	+	1	2.5	0.0
	K-6	3	2	23.0	+	2	5.0	50.0
	K-7	3	2	22.0	+	0	0.0	-
	K-8	3	2	18.5	+++	0	0.0	-
	K-9	3	2	20.0	++	1	2.5	0.0
Total		27	17	21.1		6	1.8	16.7
2x x 4x	K-1	3	2	16.5	-	0	0.0	-
	K-2	3	2	23.0	± ²⁾	0	0.0	-
	K-3	3	2	17.5	+	0	0.0	-
	K-4	3	1	21.0	+	0	0.0	-
	K-5	3	2	21.0	+	0	0.0	-
	K-6	3	2	19.0	+++	0	0.0	-
	K-7	3	2	19.0	±	0	0.0	-
	K-8	3	2	19.5	+	0	0.0	-
	K-9	3	2	18.5	+++	0	0.0	-
Total		27	17	20.6		0	0.0	-

1): Refer to Table 31.
2): Roots were formed from the callus.

Table 38-2. Interacting effects of IAA and kinetin on cultured ovaries in 4x x 4x and 4x x 2x

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
4x x 4x							
K-1	3	1	22.0	±	2	8.3	0.0
K-2	2	1	23.0	+	5	20.8	20.0
K-3	3	2	23.0	++ ²⁾	2	4.2	0.0
K-4	3	1	1.0	-	0	0.0	-
K-5	3	2	18.0	++	1	2.1	0.0
K-6	3	2	20.0	+++	1	2.1	0.0
K-7	3	2	24.5	±	3	6.3	66.7
K-8	3	2	22.0	+	0	0.0	-
K-9	3	2	21.0	+++	6	12.5	16.7
Total	27	15	21.3		20	5.6	20.0
4x x 2x							
K-1	3	2	34.0	±	0	0.0	-
K-2	3	2	28.5	± ²⁾	1	2.1	0.0
K-3	3	1	31.0	++ ²⁾	0	0.0	-
K-4	3	2	22.0	±	1	2.1	0.0
K-5	3	2	24.0	++	1	2.1	0.0
K-6	3	2	21.5	+++	0	0.0	-
K-7	3	1	32.0	±	0	0.0	-
K-8	3	2	31.5	±	0	0.0	-
K-9	3	2	30.0	+++ ²⁾	0	0.0	-
Total	27	16	28.5		3	0.8	0.0

1): Refer to Table 31.

2): Roots were formed from the callus.

したものと較べてみると(表24, No.2), 11
 ずれも生育が劣つてゐたが, $2x \times 2x$ にはあつて
 はその差が小さかつた。 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ では
 莖の平均長が自然条件下で生育したものに較
 べ, 約半分であつた。また, 図11に示すよう
 に植物体から切り取つた切り口からカルス組
 織の発達したものがみられた(図11)。カル

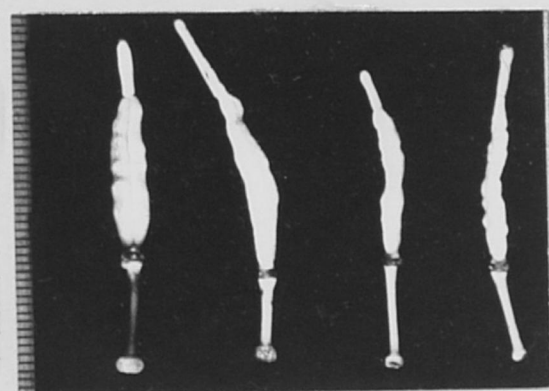


Fig. 11. Callus formation
 at the cut end of cultured
 ovaries, right to left; \pm ,
 $+$, $++$, $+++$, showing differ-
 ent degree of callus forma-
 tion.

ス形成に ついては,

IAA とカイネチンが
 相互作用があり, K6
 と K-9 区, 即ち IAA
 5mg/l とカイネチン
 0.1mg/l , IAA 5mg/l
 とカイネチン 0.5mg/l
 を含む区で, カルス
 形成が目立つた。カ

ルスから根の発生もみられた。カルスを形成
 しなゝものからは根の発生は見られなかつた。
 カルスが形成されてゐる場合, その程度と根
 の発生との間には直接の関係はみられなかつ

た。得られた種子は $2x \times 2x$ で 6 粒, $4x \times 4x$ で 20 粒, $4x \times 2x$ で 3 粒であった。 $2x \times 4x$ においては種子は得られなかった。発芽率は自然条件下で得られた種子の発芽率に比べ、著しく低かった。 $4x \times 2x$ の組合せの種子はいずれも不発芽に終わった。種子形成については、カルスの場合と異なっており、IAA とカイネチンの相互作用はみられなかった。

IAA とジベレリンの相互作用： IAA とジベレリンの相互作用を調査した結果をまとめて表 39-1 と表 39-2 に示す (表 39-1, -2)。表 39-1 は $2x \times 2x$ と $2x \times 4x$ の結果を示し、表 39-2 は $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の結果を示した。莢の長さは IAA とカイネチンを含む区と同じか、それ以上の発達を示した。 IAA とジベレリンの濃度差による生育の差異はみられず、どの区においても同じような生育状態を示した。交配組合せの点からみると、 $2x$ を母親として

Table 39-1. Interacting effects of IAA and Gibberellin on cultured ovaries in 2x x 2x and 2x x 4x

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	G-1	3	2	18.0	-	0	0.0	-
	G-2	3	2	21.0	-	1	2.5	0.0
	G-3	3	2	20.5	-	1	2.5	0.0
	G-4	3	2	22.0	-	1	2.5	0.0
	G-5	3	2	27.5	-	0	0.0	-
	G-6	3	2	19.0	±2)	0	0.0	-
	G-7	3	2	23.5	-	0	0.0	-
	G-8	3	2	21.5	-	0	0.0	-
	G-9	3	2	18.5	±	0	0.0	-
Total		27	18	21.2		3	0.8	0.0
2x x 4x	G-1	3	2	22.5	-	0	0.0	-
	G-2	3	2	22.0	-	0	0.0	-
	G-3	3	2	28.5	+2)	0	0.0	-
	G-4	3	2	31.5	-	0	0.0	-
	G-5	3	2	21.5	±2)	0	0.0	-
	G-6	3	2	20.5	+2)	0	0.0	-
	G-7	3	2	21.5	-	0	0.0	-
	G-8	3	2	27.0	±2)	0	0.0	-
	G-9	3	2	20.5	±	0	0.0	-
Total		27	18	23.8		0	0.0	-

1): Refer to Table 31.
2): Roots were formed from the callus.

Table 39-2. Interacting effects of IAA and gibberellin on cultured ovaries in 4x x 4x and 4x x 2x

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
4x x 4x							
G-1	3	2	27.0	-	3	6.3	33.3
G-2	3	2	23.5	±2)	5	10.4	40.0
G-3	3	2	24.0	±2)	5	10.4	40.0
G-4	3	2	25.0	±	2	4.2	50.0
G-5	3	2	27.0	±2)	4	8.3	75.0
G-6	3	2	31.5	±2)	1	2.1	0.0
G-7	3	2	30.0	-	4	8.3	0.0
G-8	3	2	38.0	±	2	4.2	50.0
G-9	3	2	31.5	±2)	2	4.2	50.0
Total	27	18	28.6		28	6.5	39.3
4x x 2x							
G-1	3	2	30.5	-	0	0.0	-
G-2	3	2	24.5	-	0	0.0	-
G-3	3	2	30.0	-	0	0.0	-
G-4	3	2	29.5	±	0	0.0	-
G-5	3	2	28.0	-	0	0.0	-
G-6	3	2	26.0	±2)	0	0.0	-
G-7	3	2	29.5	-	0	0.0	-
G-8	3	2	29.0	-	0	0.0	-
G-9	3	2	29.5	-	0	0.0	-
Total	27	18	28.4		0	0.0	-

1): Refer to Table 31.

2): Roots were formed from the callus.

用いたもののオが4xを母親として用いたものよりも短かった。カルスの形成については、全般的に不良で、IAAを全く含まない区(G-1, G-4, G-7)ではカルスの形成はみられなかった。カルスからの発根の頻度は高く、IAA 5mg/l とジベレリン 1mg/l の区(G-6)ではどの組合せからでも発根がみられ、その頻度が最も高かった。得られた種子は2x x 2xでは3粒、4x x 4xでは29粒(すべての区から得られた)得られたが、2x x 4xと4x x 2xからは得られなかった。得られた種子の発芽率は著しき種子数が少ない場合が高かった。

トマトジュースとイースト抽出物： トマトジュースとイースト抽出物を基本培地に添加したときの種子形成の状態を表40に示す(表40)。莢の長さはイースト抽出物を添加したもののでは2x x 2xが最も長く、他の区では2xを母親にしたオが4xを母親にしたものよりも短

Table 4.0. Effects of tomato juice and yeast extract on cultured ovaries

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	5	4	23.3	-	0	0.0	-
T-1	4	3	27.3	-	0	0.0	-
T-2	3	2	25.5	+	0	0.0	-
T-3	3	2	31.0	-	1	2.5	0.0
Y-1	15	11	26.2		1	0.5	0.0
Total							
2x x 4x	3	2	24.0	-	0	0.0	-
T-1	3	2	25.5	-	0	0.0	-
T-2	3	2	24.0	±	0	0.0	-
T-3	3	2	22.0	±	0	0.0	-
Y-1	12	8	23.6		0	0.0	-
Total							
4x x 4x	3	2	26.5	-	1	2.1	0.0
T-1	3	2	28.5	+	1	2.1	0.0
T-2	3	2	26.5	+	0	0.0	-
T-3	3	2	24.5	±	1	2.1	0.0
Y-1	12	8	26.4		3	1.6	0.0
Total							
4x x 2x	3	2	30.5	-	1	2.1	0.0
T-1	2	1	33.0	±	1	4.2	0.0
T-2	3	2	31.5	±	0	0.0	-
T-3	4	3	29.3	±	1	1.4	0.0
Y-1	12	8	30.1		3	1.6	0.0
Total							

1): T-1, basal medium (=K-1, G-1), T-2 and T-3, basal medium added to tomato juice 15% and 25% respectively, Y-1, basal medium added to yeast extract (2g/l).

くなつてゐた。切り口におけるカルス形成については、トマトジュース・イースト抽出物の添加法で僅かにみられた。2x からの発根はなかった。得られた種子は $2x \times 2x$ 2粒、 $4x \times 4x$ 2粒、 $4x \times 2x$ 2粒であったが、どのいずれも発芽しなかった。 $2x \times 4x$ からは種子は得られなかった。

更に、IAA, カイネチン, ジベレリンと種々の栄養物質の相互作用と比較検討するためには表32の培地を用いて培養を行なつた。

表41は基本培地に IAA, カイネチン, ジベレリンと単独或いは混合して添加した培地を用いた時の結果を示す(表41)。莖の長さは $4x$ と母親として用いたもののオが、 $2x$ と母親として用いたものよりよく、IAA, カイネチン, ジベレリン等の生長調整物質の添加による差異はなかった。カルス形成の程度の差は個体間にみられたが、培養基組成による差異はなく、余りよい発達はみられなかった。種子形成については、 $4x \times 4x$ のオが $2x \times 2x$ より

Table 41. Interacting effects of growth substances on cultured ovaries

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x							
NO	8	7	22.7	±2)	1	0.7	100
NI	8	7	19.3	+	0	0.0	-
NK	8	7	22.1	+	1	0.7	0.0
NG	8	7	21.7	±	1	0.7	0.0
NT	8	7	20.7	++	0	0.0	-
Total	40	35	21.9		3	0.4	33.3
2x x 4x							
NO	9	8	25.3	±	0	0.0	-
NI	9	8	20.6	±	0	0.0	-
NK	8	7	21.0	±	0	0.0	-
NG	9	8	23.0	±	0	0.0	-
NT	9	8	20.8	+	0	0.0	-
Total	44	39	22.2		0	0.0	-
4x x 4x							
NO	8	7	30.9	±	7	4.2	71.4
NI	8	7	28.0	±	0	0.0	-
NK	8	7	31.0	+	5	3.0	40.0
NG	8	7	32.7	±	2	1.2	50.0
NT	8	7	27.0	+	1	0.6	0.0
Total	40	35	29.9		15	1.8	46.7
4x x 2x							
NO	9	8	32.1	-	0	0.0	-
NI	9	8	29.0	-	0	0.0	-
NK	8	7	29.0	±	0	0.0	-
NG	9	8	32.9	±	1	0.5	0.0
NT	9	8	28.3	-	0	0.0	-
Total	44	39	30.3		1	0.1	0.0

1): Refer to Table 32, 2): Roots were formed from the callus.

も良く、その発芽率はいずれの場合も基本培地だけのものが最も良かった。 $2x \times 4x$ 2" はどの区においても種子の形成はなかった。

$4x \times 2x$ 2" はジベレリン添加区において1粒みられたが、発芽しなかった。

基本培地にはトマトジュースと生長調整物質を添加した培養基についての結果を表42に示す(表42)。莢の生長は他の区と同じであった。カルス形成については個体変異が大きく、同じ培地においても発達の非常に良いものから、ほとんどカルスを形成しないものまで観察された。種子は全く得られなかった。

イースト抽出物を添加した培地についての結果を表43に示す(表43)。莢の長さには雌雄傾向がみられた。即ち $2x$ を母親とした交配の子が $4x$ のそれよりも短かった。カルスの形成は全般的に良かった。成熟種子の形成については、 $2x \times 2x$ は $4x \times 4x$ に較べると、どの培養基組成区にあってもより結果を示したが、その発芽率は低く最高63.6%であった。 $2x \times 4x$

Table 4-2. Interacting effects of growth substances and tomato juice on cultured ovaries

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average capsule length (mm)	Average callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)
2x x 2x						
TO	8	7	22.3	-	0	0.0
TI	8	7	19.1	-	0	0.0
TK	8	7	22.1	±	0	0.0
TG	8	7	22.0	±	0	0.0
TT	8	7	18.9	±	0	0.0
Total	40	35	20.9		0	0.0
2x x 4x						
TO	9	8	23.4	±	0	0.0
TI	9	7	20.0	-	0	0.0
TK	9	8	24.4	±	0	0.0
TG	9	7	23.9	±	0	0.0
TT	9	8	19.9	±	0	0.0
Total	45	38	22.3		0	0.0
4x x 4x						
TO	8	7	30.0	±	0	0.0
TI	8	7	28.9	±	0	0.0
TK	8	7	34.7	++	0	0.0
TG	8	7	36.1	±	0	0.0
TT	8	7	27.4	+	0	0.0
Total	40	35	31.4		0	0.0
4x x 2x						
TO	9	8	40.0	+	0	0.0
TI	9	8	35.1	-	0	0.0
TK	9	8	36.1	++	0	0.0
TG	9	8	39.9	+	0	0.0
TT	8	7	33.3	±	0	0.0
Total	44	39	37.1		0	0.0

1): Refer to Table 32. 2): Roots were formed from the callus.

Table 45. Intravaginal effect of growth substances and yeast extract on cultured ovaries

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	Y0	3	7	21.3	±	2	1.4	0.0
	YI	3	7	20.9	±	11	7.9	63.6
	YK	8	7	21.0	±	4	2.9	0.0
	YG	8	7	22.0	±	7	5.0	28.7
	YT	8	7	22.6	+	11	7.9	18.2
Total		40	35	21.5		35	5.0	31.4
2x x 4x	Y0	9	8	21.3	±	0	0.0	-
	YI	3	7	26.0	±	0	0.0	-
	YK	8	7	24.0	±	0	0.0	-
	YG	10	9	21.8	±	0	0.0	-
	YT	10	8	24.6	+	0	0.0	-
Total		45	39	23.4		0	0.0	-
4x x 4x	Y0	7	6	30.7	±	2	1.4	50.0
	YI	7	6	36.2	±	1	0.7	0.0
	YK	3	7	35.7	+	1	0.6	0.0
	YG	8	7	31.6	+	2	1.2	50.0
	YT	8	7	30.7	+	5	3.0	0.0
Total		33	33	32.9		11	1.4	18.2
4x x 2x	Y0	8	7	32.6	±	2	1.2	50.0
	YI	7	6	33.8	±	0	0.0	-
	YK	7	6	33.7	+	0	0.0	-
	YG	6	5	31.8	+	0	0.0	-
	YT	8	7	28.0	+	0	0.0	-
Total		36	31	30.8		2	0.3	50.0

1): Refer to Table 32.

では見熟種子は得られなかったが、 $4x \times 2x$ にあつては10区で2粒の種子が得られた。そのうちの1粒は発芽し、3倍体雑種植物として生育した。

表44は基本培地にカゼイン酸分解物を IAA, カイネチン, ジベレリンと色々組合せて添加したときの結果を示す(表44)。莢の長さについては培地による差異はみられなかった。母親による差異は明瞭であつた。カルス形成は全般的に良好であつた。カルスからの発根もみられた。種子形成については、 $2x \times 2x$ では成熟種子が7粒得られ、うち2粒が発芽した。これに対し、 $4x \times 4x$ における種子形成は全にわたつてよく、着粒率が13.7% (ChO)に達するものもみられた。得られた種子の合計は77粒であつた。これらの種子の発芽率は最高79%, 平均46%であつた。 $2x \times 4x$ の交配種子は1粒も得られず、 $4x \times 2x$ においても、2粒の良く発達した種子が得られたが、不発芽であつた。種子形成に関しては、培地による

Table 44. Anticancer hydrolyzates on cultured ovaries

Cross	Medic ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	ChO	8	7	21.7	±	2	1.4	0.0
	ChI	8	7	18.4	±	1	0.7	0.0
	ChK	8	7	20.7	±	0	0.0	-
	ChG	8	7	19.4	±	4	2.9	50.0
	ChT	8	7	16.7	++	0	0.0	-
Total		40	35	19.4		7	1.0	28.5
2x x 4x	ChO	9	8	22.8	± ²⁾	0	0.0	-
	ChI	10	8	18.3	±	0	0.0	-
	ChK	9	8	21.8	±	0	0.0	-
	ChG	9	8	21.9	±	0	0.0	-
	ChT	8	7	17.7	+	0	0.0	-
Total		45	39	20.5		0	0.0	-
4x x 4x	ChO	8	7	36.9	+	23	13.7	56.5
	ChI	8	7	30.3	+	14	8.3	0.0
	ChK	8	7	37.9	+	12	7.1	66.7
	ChG	8	7	37.6	±	19	11.3	78.9
	ChT	8	7	30.7	+	9	5.4	0.0
Total		40	35	34.7		77	9.2	45.5
4x x 2x	ChO	9	8	34.5	+ ²⁾	1	0.5	0.0
	ChI	8	7	29.6	+	0	0.0	-
	ChK	9	8	35.4	+ ²⁾	1	0.5	0.0
	ChG	9	8	33.8	+	0	0.0	-
	ChT	9	8	30.5	++	0	0.0	-
Total		44	39	26.4		2	0.2	0.0

1): Refer to Table 32. 2): Roots were formed from the callus.

明瞭な差異は認められなかった。

ココナットミルクと生長調整物質を添加した培地についてその結果を表45に示す(表45)。
 葉の生育は $2x$ を母親として用いたものが $4x$ を母親としたものよりよい生育を示した。カルス形成については全般的に良い発達がみられ、
 茎からの根の形成もよかった。得られた種子数は、 $2x \times 2x$ で29粒、 $4x \times 4x$ で17粒、 $2x \times 4x$ で2粒であった。 $4x \times 2x$ には1粒の種子も得られなかった。 $2x \times 2x$ 、 $4x \times 4x$ の両交配ともかなりの種子数を得たが、 $2x \times 2x$ の方が $4x \times 4x$ よりもよかった。ココナットミルクを含む培地で $2x \times 4x$ の交配種子が2粒得られた(CMO, CLEG)。これらはいずれも発芽して3倍性の雑種植物として生育した。得られた種子の発芽率は $2x \times 2x$ で平均28%であったが、 $4x \times 4x$ では59%で、 $2x \times 2x$ よりも良い発芽率を示した。

ココナットミルクとカゼイン酸分解物を生長調整物質と組合せて添加した培地について

Cross	Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation.	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	CMO	8	7	24.6	+	7	5.0	85.7
	CM1	8	7	21.6	++ ²⁾	7	5.0	0.0
	CMK	8	7	25.7	+	5	3.6	40.0
	CMG	8	7	23.6	+	5	3.6	40.0
	CMT	8	7	21.1	++	5	3.6	0.0
Total		40	35	22.5		29	4.1	27.6
2x x 4x	CMO	9	8	25.6	+	1	0.6	100
	CM1	8	6	24.8	++ ²⁾	0	0.0	-
	CMK	9	8	25.5	++	0	0.0	-
	CMG	8	7	26.0	++	1	0.7	100
	CMT	9	7	27.4	++	0	0.0	-
Total		43	36	25.9		2	0.3	100
4x x 4x	CMO	8	7	34.7	++ ²⁾	6	3.6	66.7
	CM1	8	7	30.7	++ ²⁾	1	0.6	0.0
	CMK	8	7	35.1	+++	4	2.4	75.0
	CMG	8	7	33.6	++ ²⁾	3	1.8	100
	CMT	8	7	29.7	++	3	1.8	0.0
Total		40	35	32.8		17	2.4	58.8
4x x 2x	CMO	9	8	31.8	++	0	0.0	-
	CM1	8	7	30.9	++	0	0.0	-
	CMK	9	8	35.4	++	0	0.0	-
	CMG	9	7	37.0	+	0	0.0	-
	CMT	9	8	31.8	++	0	0.0	-
Total		44	38	33.3		0	0.0	-

1): Refer to Table 32. 2): Roots were formed from the callus.

Table 46. Interacting effects of growth substances, coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	CMChO	8	7	22.1	+	1	0.7	100
	CMChI	8	7	19.0	++	0	0.0	-
	CMChK	8	7	22.6	++	2	1.4	50.0
	CMChG	8	7	20.9	++	2	1.4	50.0
	CMChT	8	7	18.9	+++	0	0.0	-
Total		40	35	20.7		5	0.7	60.0
2x x 4x	CMChO	11	10	30.5	+	0	0.0	-
	CMChI	9	8	28.4	++	0	0.0	-
	CMChK	9	8	29.8	++	0	0.0	-
	CMChG	8	6	30.0	+	0	0.0	-
	CMChT	9	8	30.0	++	0	0.0	-
Total		46	40	29.8		0	0.0	-
4x x 4x	CMChO	8	7	32.4	+	9	5.4	55.6
	CMChI	8	7	29.3	+	8	4.8	37.5
	CMChK	8	7	30.7	++	15	9.5	56.3
	CMChG	8	7	32.1	++	12	7.1	33.3
	CMChT	8	7	29.7	++	15	8.9	60.0
Total		40	35	30.9		60	7.1	50.0
4x x 2x	CMChO	9	8	36.4	++	0	0.0	-
	CMChI	9	8	31.9	++	0	0.0	-
	CMChK	9	8	37.6	+++	0	0.0	-
	CMChG	9	8	33.9	+++	1	0.5	100
	CMChT	9	8	29.6	++	0	0.0	-
Total		45	40	33.9		1	0.1	100

1): Refer to Table 32. 2): Roots were formed from the callus.

の結果と表46に示す(表46)。莢の長さは傾
 斜傾向を示した。カルス形成はココナットミ
 ルクと添加した培地と同等か、それ以上に良
 好であった。種子形成については、 $2x \times 2x$ の
 組合せで5粒であったのに対し、 $4x \times 4x$ では
 60粒の種子が得られた。しかしながら発芽率
 は $4x \times 4x$ の方が $2x \times 2x$ よりも低かった。交雑
 種子の形成については、 $2x \times 4x$ では1粒の種
 子も得られなかったが、 $4x \times 2x$ では1粒得ら
 れ(CMChG)、発芽して3倍性の雑種植物として
 生育した。

種子形成における生長調整物質と添加した栄
養物質の効果について： 今まで調査した種
 子形成と生長調整物質と栄養物質の点から吟味
 した。表47は生長調整物質についてまとめた
 もので、これ等の中にはいずれの区においても
 も、トコトジユース、イースト抽出物、カゼ
 イン分解物、ココナットミルクを含んで

Table 47. Interacting effects of growth substances on seed set and seed germination

Medium	Cross combination 2)				
	$2x \times 2x$	$2x \times 4x$	$4x \times 4x$	$4x \times 2x$	Total (%)
N	8/13	1/1	29/47	1/3	39/64 60.9
IAA	7/19	0/0	3/24	0/0	10/43 23.3
K	3/12	0/0	22/38	0/1	25/51 49.0
GA	7/19	1/1	24/38	1/2	33/60 55.0
T	2/16	0/0	9/33	0/0	11/49 22.4
Total	27/79	2/2	87/180	2/6	118/264
(%)	34.2	100	48.3	33.3	44.2

1): Refer to Table 32.

2): No. of seeds germinated/no. of seeds obtained.

Table 48. Interacting effects of different nutrients on seed set and seed germination

Medium ¹⁾	Cross combination 2)					Total (%)
	2x x 2x	2x x 4x	4x x 4x	4x x 2x		
NO	1/3	0/0	8/15	0/0	9/19	47.4
TJ	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	-
YE	11/35	0/0	2/11	1/2	14/48	29.2
Ch	2/7	0/0	36/77	0/2	38/86	44.2
CM	10/29	2/2	10/17	0/0	22/48	45.8
CMCh	3/5	0/0	31/60	1/1	34/66	51.5
Total (%)	27/79	2/2	87/180	2/6	118/265	
	34.2	100	48.3	33.3	44.2	

1): Refer to Table 52.

2): No. of seeds germinated/no. of seeds obtained.

る(表47)。得られた種子とその発芽率を調査したが、 $4x \times 4x$ の得られた種子数は $2x \times 2x$ の2.3倍であり、その発芽率は48.3%と34.2%であった。生長調整物質による比較をみると $2x \times 2x$ ではIAAとジベレリン添加区において種子形成は良かったが、その発芽率は基本培地だけのものが61.5%と最も高かった。

$4x \times 4x$ においては生長調整物質を添加しなくてもこの区にみられたものよりも、無添加の区において着粒率も発芽率も最も良好であった。 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ においては雑穂個体が多かったのは無添加区とジベレリン添加区においてであった。基本培地に生長調整物質を添加したものに於ける各交配組合せの全種子についてみるとジベレリン区が最も良く、これにカイネチン区と全部添加した区が続いているが、基本培地だけのものが得られた種子もその発芽率も最高であった。

表48は添加した栄養物質についてまとめたもので、いずれの区においてもIAA、カイネ

4 \times 2, ジベリリンを含む(表48)。
 得られた種子とその発芽率についてみると、
 2 \times 2 \times 2 \times 2はイースト抽出物とココナットミルク
 添加区において良好な種子形成がみられた。
 4 \times 2 \times 4 \times 2は得られた種子数が多かったが、特
 にカゼイン酸分解物とココナットミルクとカ
 ゼイン酸分解物添加区において良好な種子形
 成がみられた。2 \times 2 \times 4 \times 2はココナットミルク
 添加区において、4 \times 2 \times 2 \times 2はイースト抽出物
 とカゼイン酸分解物とココナットミルク添加
 区において、それぞれ雑種個体を得ることが
 できた。培地には炭養物質を添加したものに
 ける各組合せの種子形成をみると、まずト
 トジューズ添加区では全く種子形成がなかった。
 他炭養物質添加区においては、無添加
 の区に較べて種子形成は非常に良くなった。
 カゼイン酸分解物においては約4.5倍で最
 も高く、次にカゼイン酸分解物とココナ
 トミルク添加区、ココナットミルク添加区、
 イースト抽出物添加区の順であった。

以上のことから子房の人工培養においては生長調整物質の種類の違いによるよりも、栄養物質の種類によって、種子形成にはっきりとした相違がみられた。

子房の培養で得られた交雑種子とその植物個体：
子房の培養で得られ発芽して生育した種子は $2x \times 4x$ で2粒 (CMO, CMG) と $4x \times 2x$ で2粒 (YEO, CMChG) があった (図12)。生育した個体

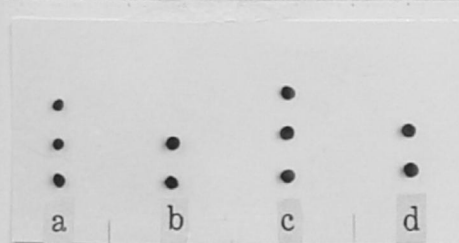


Fig. 12. Hybrid seeds produced by ovary culture. a: $2x \times 2x$, b: $2x \times 4x$, c: $4x \times 4x$, d: $4x \times 2x$.

の葉の形態と倍數性を表49に示す (表49)。

また、植物体全体を図13に示す (図13)。交配親に使用した体菜 ($2x$) と白菜 ($4x$) に較

べ、交雑種子から得た個体は両者の中間型を示した。 $2x \times 4x$ から得られた2個体は「いずれも同じような形態を示したが、 $4x \times 2x$ からの2個体は形態を少し異にし、 YEO 2 から得ら

Table 49. Morphology of leaves of the hybrid plants obtained from ovary culture

Plant	Shape of leaf tip	Leaf thickness		Leaf surface	Floidy
	Notched Round	Thick	Thin	Rough Smooth	
2x x 2x	*		*	*	2x
4x x 4x	*	*		*	4x
2x x 4x (CMO)	*	*		*	3x
2x x 4x (CMG)	*	*		*	3x
4x x 2x (YEO)	*	*		*	3x
4x x 2x (CMChG)	*	*		*	3x

けたもの (図13e) は $2x \times 4x$ の個体と同じく
 葉全体の形は丸かっぱ形, CMChG から得ら
 れたもの (図13f) の葉は細長かっぱ形。これ
 等の個体の細胞学的な観察からいずれも三倍
 性雑種であることがわかった。

子房の人工培養においては, 培養物質の種
 類の差異によつて種子形成の割合が異なつて
 いたことから, 基本培地に添加する培養物質
 のうち, イースト抽出物, カゼイン分解物,
 ココナットミルクの三者を組合せた培地とつ

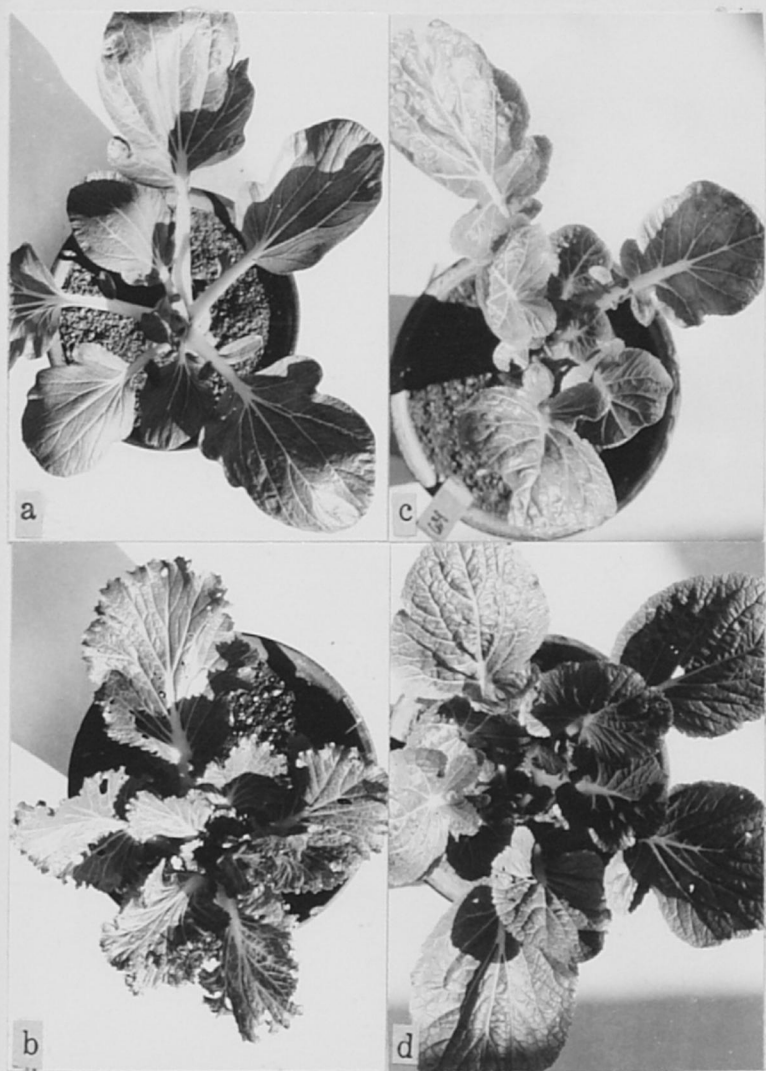


Fig. 13. Hybrid plants obtained from ovary culture.
 a: Diploid Brassica campestris ssp. chinensis (L.) Makino.
 b: Autotetraploid B. campestris ssp. pekinensis (Lour.) Olsson.
 c and d: Two F_1 hybrids from the cross, $2x \times 4x$.



e and f: Two F_1 hybrids from the cross, $4x \times 2x$.

くつて、種子形成等と調査した。その栄養物質の組合せを表33, 表34, 表35, と表36に示した。

イースト抽出物とカゼイン酸分解物の添加による相互作用: 表33に示す培地を用いてイースト抽出物とカゼイン酸分解物の相互作用を調査した。その結果を表50-1, -2, -3, と-4に示す。收穫時における莖の長さは $2x \times 2x$ と $2x \times 4x$ においてほぼ同じであったが, $4x \times$

Table 50-1. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in $2x \times 2x$

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEC-1	7	7	18.3	-	1	0.7	100
YEC-2	7	7	16.7	+	0	0.0	-
YEC-3	7	5	17.2	±	0	0.0	-
YEC-4	7	7	17.9	-	0	0.0	-
YEC-5	7	7	17.0	±	1	0.7	100
YEC-6	8	8	18.3	±	1	0.7	100
YEC-7	7	7	18.9	±	0	0.0	-
YEC-8	7	7	17.7	-	0	0.0	-
YEC-9	7	5	20.0	±	0	0.0	-
YEC-10	7	6	18.2	±	0	0.0	-
YEC-11	7	7	19.6	±	0	0.0	-
YEC-12	7	7	19.6	-	0	0.0	-
YEC-13	7	5	20.0	-	0	0.0	-
YEC-14	7	5	19.4	±	1	0.7	100
YEC-15	7	7	20.7	±	0	0.0	-
YEC-16	7	5	15.8	-	0	0.0	-
Total	113	102	18.4		4	0.2	100

1): Refer to Table 33.

Table 50-2. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in $2x \times 4x$

Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEO-1	7	7	16.1	-	0	0.0	-
YEO-2	7	7	18.0	±	0	0.0	-
YEO-3	7	7	17.4	±	0	0.0	-
YEO-4	7	7	16.7	-	0	0.0	-
YEO-5	7	7	18.4	±	0	0.0	-
YEO-6	7	7	15.7	±	0	0.0	-
YEO-7	7	7	18.6	±	0	0.0	-
YEO-8	7	7	17.4	-	0	0.0	-
YEO-9	7	7	20.6	-	0	0.0	-
YEO-10	7	7	17.7	±	0	0.0	-
YEO-11	7	7	20.4	±	0	0.0	-
YEO-12	7	7	20.9	±	0	0.0	-
YEO-13	7	7	20.7	-	0	0.0	-
YEO-14	7	7	18.6	±	0	0.0	-
YEO-15	7	7	18.4	±	0	0.0	-
YEO-16	7	6	19.0	-	0	0.0	-
Total	112	111	18.2		0	0.0	-

1): Refer to Table 55.

Table 50-3. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEC-1	7	7	18.9	-	0	0.0	-
YEC-2	7	7	19.9	±	1	0.6	0.0
YEC-3	7	7	20.4	±	0	0.0	-
YEC-4	7	7	19.9	-	0	0.0	-
YEC-5	7	7	22.0	±	2	1.2	100
YEC-6	7	7	19.4	±	0	0.0	-
YEC-7	7	7	20.5	-	0	0.0	-
YEC-8	7	7	20.4	-	0	0.0	-
YEC-9	7	7	20.3	±	0	0.0	-
YEC-10	7	7	21.3	±	0	0.0	-
YEC-11	7	7	19.8	±	0	0.0	-
YEC-12	7	6	22.3	-	0	0.0	-
YEC-13	7	7	22.6	±	2	1.2	0.0
YEC-14	7	6	19.8	±	0	0.0	-
YEC-15	7	7	20.3	±	0	0.0	-
YEC-16	7	7	20.7	-	0	0.0	-
Total	112	110	20.2		5	0.2	40.0

1): Refer to Table 33.

Table 50-4. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEC-1	7	7	26.7	+	0	0.0	-
YEC-2	7	7	26.3	+	0	0.0	-
YEC-3	7	7	28.6	±	0	0.0	-
YEC-4	7	7	25.0	-	0	0.0	-
YEC-5	7	7	29.0	+	0	0.0	-
YEC-6	7	7	27.9	±	0	0.0	-
YEC-7	7	7	27.6	-	0	0.0	-
YEC-8	7	7	24.9	+	0	0.0	-
YEC-9	7	7	31.3	+	1	0.6	0.0
YEC-10	7	7	24.7	±	0	0.0	-
YEC-11	7	7	24.7	±	0	0.0	-
YEC-12	7	7	28.4	-	0	0.0	-
YEC-13	7	7	29.4	±	0	0.0	-
YEC-14	7	7	27.0	-	0	0.0	-
YEC-15	7	7	28.7	±	0	0.0	-
YEC-16	7	7	27.4	±	0	0.0	-
Total	112	112	27.3		1	0.04	0.0

1): Refer to Table 55.

$4x$ と $4x \times 2x$ には、後者の方が良かった。
 カルスの形成は僅かにみられたが、イースト
 抽出物とカゼイン酸分解物の添加量を増加し
 ても、それほどの変化はみられなかった。

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の種子形成については、 $2x \times 2x$
 で4粒、 $4x \times 4x$ で5粒しか得られなかった。

その傾向をみると、いずれもイースト抽出物
 の添加量の少ない培養基には、種子形成
 がみられ、 $5g/l$ や $10g/l$ のイースト抽出物を
 添加したものの場合はカゼイン酸分解物の添加量
 に関係なく種子は得られなかった。得られた
 種子の発芽率は $2x \times 2x$ では100%であったが、
 $4x \times 4x$ では40%であった。 $2x \times 4x$ には
 いずれにも種子形成はなかった。 $4x \times 2x$
 には、カゼイン酸分解物 $1000 mg/l$ を
 加した区(YEC-9)には、1粒の種子が得ら
 れたが、不発芽であった。

ココナットミルクとイースト抽出物の添加に
 よる相互作用：表34に示した培養地を用いて

Table 51-1. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CNVE-1	7	7	20.0	-	0	0.0	-
CNVE-2	7	7	21.0	-	0	0.0	-
CNVE-3	7	7	21.0	-	0	0.0	-
CNVE-4	7	7	20.9	±	0	0.0	-
CNVE-5	7	7	19.9	-	0	0.0	-
CNVE-6	7	6	19.2	±	0	0.0	-
CNVE-7	7	7	21.0	-	0	0.0	-
CNVE-8	7	7	21.4	-	0	0.0	-
CNVE-9	7	7	20.9	-	1	0.7	0.0
CNVE-10	7	7	21.7	-	0	0.0	-
CNVE-11	7	7	21.6	±	0	0.0	-
CNVE-12	7	7	21.4	-	0	0.0	-
CNVE-13	7	7	19.7	-	0	0.0	-
CNVE-14	7	7	21.9	-	0	0.0	-
CNVE-15	7	7	21.6	-	0	0.0	-
CNVE-16	7	7	21.6	-	0	0.0	-
Total	112	111	20.9		1	0.05	0.0

1): Refer to Table 54.

Table 51-2. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 2x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMYE-1	7	7	20.0	-	0	0.0	-
CMYE-2	7	7	22.3	-	0	0.0	-
CMYE-3	7	7	20.6	±	0	0.0	-
CMYE-4	7	7	24.3	#	0	0.0	-
CMYE-5	7	7	21.3	-	0	0.0	-
CMYE-6	7	6	22.7	-	0	0.0	-
CMYE-7	7	7	22.4	-	0	0.0	-
CMYE-8	7	7	21.1	#	0	0.0	-
CMYE-9	7	7	20.6	-	0	0.0	-
CMYE-10	7	7	21.7	-	0	0.0	-
CMYE-11	7	7	21.9	#	0	0.0	-
CMYE-12	7	7	22.0	-	0	0.0	-
CMYE-13	7	7	19.7	-	0	0.0	-
CMYE-14	7	7	21.3	-	0	0.0	-
CMYE-15	7	7	22.4	-	0	0.0	-
CMYE-16	7	7	21.4	-	0	0.0	-
Total	112	111	21.8		0	0.0	-

1): Refer to Table 74.

Table 51-3. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
OME-1	7	7	19.3	-	0	0.0	-
OME-2	7	7	21.9	+	0	0.0	-
OME-3	7	7	20.6	±	0	0.0	-
OME-4	7	7	23.7	+	0	0.0	-
OME-5	7	6	20.5	-	0	0.0	-
OME-6	7	7	19.3	-	0	0.0	-
OME-7	7	7	20.1	-	0	0.0	-
OME-8	7	7	22.3	±	0	0.0	-
OME-9	7	7	21.1	-	0	0.0	-
OME-10	7	6	20.2	-	0	0.0	-
OME-11	7	7	23.3	-	0	0.0	-
OME-12	7	7	20.9	+	0	0.0	-
OME-13	7	7	20.7	-	0	0.0	-
OME-14	7	7	20.9	+	0	0.0	-
OME-15	7	6	22.2	-	0	0.0	-
OME-16	7	7	22.0	±	0	0.0	-
Total	112	109	21.2		0	0.0	-

1): Refer to Table 54.

Table 51-4. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMYE-1	7	7	27.4	-	0	0.0	-
CMYE-2	7	7	25.6	+	0	0.0	-
CMYE-3	7	7	28.3	+	0	0.0	-
CMYE-4	7	7	28.6	+	0	0.0	-
CMYE-5	7	7	27.4	±	0	0.0	-
CMYE-6	7	7	26.9	±	0	0.0	-
CMYE-7	7	6	25.7	±	0	0.0	-
CMYE-8	7	7	26.0	±	0	0.0	-
CMYE-9	7	6	29.2	±	0	0.0	-
CMYE-10	7	7	27.1	-	0	0.0	-
CMYE-11	7	7	25.9	±	0	0.0	-
CMYE-12	7	7	25.9	±	0	0.0	-
CMYE-13	7	7	26.3	±	0	0.0	-
CMYE-14	7	7	26.7	±	0	0.0	-
CMYE-15	7	7	23.9	±	0	0.0	-
CMYE-16	7	7	25.4	-	0	0.0	-
Total	112	110	26.6		0	0.0	-

1): Refer to Table 34.

ココナットミルクとイースト抽出物の相互作用と調査した。その結果を表51-1, -2, -3と-4に示す。莢の長さは $2x \times 4x$ と $4x \times 4x$ においてそれぞれ 21.8mm と 21.2mm であり、 $2x \times 2x$ では 20.9mm と短かく、 $4x \times 2x$ では最も長く 26.6mm であった。切り口におけるカルス形成は僅かにみられたが、ココナットミルクとイースト抽出物の添加量の差量によるカルス形成の違いはみられなかった。種子形成については $2x \times 2x$ の1区 (CMYE-9) で1粒得られただけで、他のすべての培地・交雑組合せからは全く種子が得られなかった。

ココナットミルクとカゼイン酸分解物の添加による相互作用： 表35に示した培地を用いてココナットミルクとカゼイン酸分解物の相互作用を調査した。その結果を表52-1, -2, -3と-4に示す。莢の長さは、 $2x \times 2x$ と $2x \times 4x$ では 20.5mm と 20.7mm でありほぼ同じであり、 $4x \times 4x$ では 23.7mm であり $4x \times 2x$ が一番長く 26.5mm であった。

Table 52-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrollysate on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	7	7	19.1	-	1	0.7	100
CMC-2	7	7	20.1	±	0	0.0	-
CMC-3	7	7	20.6	+	3	2.1	100
CMC-4	7	7	21.6	+	0	0.0	-
CMC-5	7	7	18.3	±	2	1.4	50.0
CMC-6	7	7	19.4	+	2	1.4	50.0
CMC-7	7	7	19.6	±	1	0.7	100
CMC-8	7	7	22.0	+	2	1.4	50.0
CMC-9	8	8	22.3	-	1	0.7	100
CMC-10	7	7	20.1	±	0	0.0	-
CMC-11	7	7	20.0	+	1	0.7	100
CMC-12	7	6	19.8	+	1	0.7	100
CMC-13	7	7	21.7	-	1	0.7	100
CMC-14	7	7	21.9	+	2	1.4	100
CMC-15	8	8	21.4	++	6	4.2	100
CMC-16	7	6	20.2	-	2	1.4	100
Total	114	112	20.5		25	1.1	88.0

1): Refer to Table 35.

Table 52-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 2x x 4x

Medium	1) No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	7	7	19.7	-	0	0.0	-
CMC-2	8	8	19.8	+	0	0.0	-
CMC-3	7	7	20.6	+	1	0.7	100
CMC-4	7	7	21.6	+	0	0.0	-
CMC-5	7	7	19.3	-	0	0.0	-
CMC-6	7	7	21.0	+	0	0.0	-
CMC-7	7	7	19.1	+	0	0.0	-
CMC-8	7	7	21.0	+	0	0.0	-
CMC-9	7	7	20.7	-	0	0.0	-
CMC-10	7	7	21.6	+	0	0.0	-
CMC-11	7	7	21.7	+	0	0.0	-
CMC-12	7	7	20.9	+	0	0.0	-
CMC-15	7	7	21.9	-	0	0.0	-
CMC-14	7	7	21.9	+	0	0.0	-
CMC-15	7	7	20.6	+	0	0.0	-
CMC-16	7	6	20.3	+	0	0.0	-
Total	115	112	20.7		1	0.04	100

1): Refer to Table 35.

Table 52-3. Interacting effects of coconut milk and casein hydrollysate on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	7	7	24.6	±	0	0.0	-
CMC-2	7	7	24.9	+	1	0.6	100
CMC-3	7	7	23.7	++	0	0.0	-
CMC-4	7	7	23.0	+	0	0.0	-
CMC-5	7	7	22.7	+	1	0.6	100
CMC-6	7	7	24.0	+	1	0.6	100
CMC-7	7	7	23.9	++	0	0.0	-
CMC-8	7	7	23.0	+	0	0.0	-
CMC-9	7	7	23.0	+	2	1.2	100
CMC-10	7	7	25.4	+	0	0.0	-
CMC-11	7	7	24.1	++	0	0.0	-
CMC-12	7	7	21.9	±	0	0.0	-
CMC-13	7	6	23.3	±	0	0.0	-
CMC-14	7	7	23.7	+	0	0.0	-
CMC-15	7	7	24.7	++	0	0.0	-
CMC-16	7	7	23.7	++	0	0.0	-
Total	112	111	23.7		5	0.2	100

1): Refer to Table 35.

Table 52-4. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 4x x 2x

medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. follicle formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
CMO-1	7	6	26.0	±	1	0.6	0.0
CMO-2	7	6	26.7	++	0	0.0	-
CMO-3	7	7	26.1	++	3	1.8	33.0
CMO-4	8	8	27.0	+++	0	0.0	-
CMO-5	7	7	25.1	+	0	0.0	-
CMO-6	7	7	27.3	+	2	1.2	100
CMO-7	7	7	27.6	++	0	0.0	-
CMO-8	7	7	25.1	++	0	0.0	-
CMO-9	7	7	28.0	+	1	0.6	100
CMO-10	7	7	24.6	+	0	0.0	-
CMO-11	7	7	25.9	++	0	0.0	-
CMO-12	7	7	26.4	+++	0	0.0	-
CMO-13	7	7	27.6	+	0	0.0	-
CMO-14	7	7	31.6	+	2	1.2	50.0
CMO-15	7	7	24.7	+++	0	0.0	-
CMO-16	7	7	24.9	++	0	0.0	-
Total	113	111	26.5		9	0.3	55.6

1): Refer to Table 35.

しかし口からのカルス形成はココナツトミルクの添加量が增大すると (20% と 30%)

11ちぢるしく良くなった。2x x 2x と 4x x 4x における種子形成はよく、2x x 2x では計25粒、4x x 4x では5粒の種子が得られた。ココナツトミルクを30%添加した培地でも、2x x 2x では種子形成がみられ、またカゼイン酸分解物2000 mg/l においても種子形成はみられた。

2x x 2x にはあつては、ココナツトミルクを20%濃くした培地で最も良い種子形成がみられ、

4x x 4x ではカゼイン酸分解物だけが、ココナツトミルク10%添加が種子形成に好ましいと思われた。

ココナツトミルクとカゼイン酸分解物を添加した16区の実験区のうち、2x x 2x

区は4x x 4x 区特に良い種子形成がみられたという区はなかった。得られた種子の発芽率

はよく、2x x 2x ではほとんど100%を示し、

4x x 4x ではすべて100%であった。2x x 4x 区はココナツトミルクを20%添加した区におい

て1粒、4x x 2x 区も同様に9粒得られた。し

かしココナツトミルク30%の添加において
は種子は全く得られなかった。カゼイと酸分
解物の添加については、1000mg/lや2000mg/l
においても雑種子は得られたが、1000mg/l
以下のものが好ましいように思われた。また
 $4x \times 2x$ の交配にあつては、その収穫時に種皮
の発達はなく、胎座に付着した胚のみが
大きく成長して"torpedo"型になつてゐるもの
が存在した。得られた種子の発芽率は $2x \times$
 $4x$ で1個体、 $4x \times 2x$ で5個体の植物体を得た。
得られた雑種植物は平紙をしいたシャーレ
で発芽させ、その根端を調べて雑種かどうか
の検討を行ない、雑種植物であることを確認
した。

ココナツトミルクとカゼイと酸分解物の改良
添加による相互作用：表36に示したココナ
ツトミルクとカゼイと酸分解物の添加を修正
した培地を用いて、相互作用を調査した。そ
の結果は表53-1, -2, -3 と-4に示す。各2平

Table 53-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrollysate on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	8	8	41.6	-	28	3	17.5	89.3
CMC-2	8	8	40.0	-	26	3	16.3	19.2
CMC-3	8	8	42.0	-	35	4	21.9	51.4
CMC-4	8	8	41.5	-	5	9	3.1	80.0
CMC-5	8	8	39.9	-	13	3	3.1	92.3
CMC-6	8	8	38.5	-	9	1	5.6	66.7
CMC-7	8	8	41.3	-	37	6	23.1	67.6
CMC-8	8	8	42.8	-	33	3	20.6	51.5
CMC-9	8	8	37.8	-	20	2	12.5	95.0
CMC-10	8	8	38.8	+	30	1	18.8	60.0
CMC-11	8	7	39.0	+	29	0	18.1	44.8
CMC-12	8	8	38.1	+ ²⁾	36	0	22.5	85.3
CMC-13	8	8	34.9	-	7	1	4.4	71.4
CMC-14	8	8	38.8	++	30	1	18.8	70.0
CMC-15	8	8	38.0	++	32	1	20.0	68.8
CMC-16	8	8	39.5	+ ²⁾	49	0	30.6	79.6
Total	128	127	39.5		419	38	16.5	66.3

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.

Table 55-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrollysate on cultured ovaries in 2x x 4x

medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	8	8	36.4	-	0	15	0.0	-
CMC-2	8	8	34.1	-	0	12	0.0	-
CMC-3	8	8	36.0	-	0	4	0.0	-
CMC-4	9	9	37.3	-	0	18	0.0	-
CMC-5	8	8	32.4	-	0	6	0.0	-
CMC-6	8	8	35.0	-	0	9	0.0	-
CMC-7	8	8	36.9	+	1	32	0.6	0.0
CMC-8	8	8	36.8	-	0	17	0.0	-
CMC-9	8	8	37.6	-	2	33	1.2	50.0
CMC-10	8	8	40.5	-	0	31	0.0	-
CMC-11	8	8	38.9	+	0	36	0.0	-
CMC-12	8	8	39.8	+	1	34	0.6	100
CMC-13	8	8	36.9	-	0	35	0.0	-
CMC-14	8	8	38.4	+	0	28	0.0	-
CMC-15	8	8	37.5	-	3	38	1.9	0.0
CMC-16	8	7	37.0	+	0	4	0.0	-
Total	128	127	37.3		7	325	0.3	28.6

1): Refer to Table 36.

Table 53-3. Interacting effects of coconut milk and casein hydrollysate on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	8	7	30.6	-	15	15	3.9	66.7
CMC-2	8	8	32.0	±	5	17	2.6	20.0
CMC-3	8	8	31.8	± ²⁾	7	33	3.6	57.1
CMC-4	8	7	29.3	++	1	18	0.6	100
CMC-5	8	8	31.4	-	18	14	9.4	50.0
CMC-6	8	8	32.1	-	7	34	3.6	57.1
CMC-7	8	8	30.1	±	6	27	3.1	33.3
CMC-8	8	7	31.6	± ²⁾	3	29	1.7	100
CMC-9	8	8	32.6	±	4	9	2.1	0.0
CMC-10	8	7	36.0	+++	7	27	4.2	14.3
CMC-11	8	7	31.6	+	2	8	1.2	50.0
CMC-12	8	7	33.0	+	2	18	1.2	100
CMC-13	8	8	33.5	-	1	6	0.5	0.0
CMC-14	8	8	38.4	++	3	10	1.6	0.0
CMC-15	8	7	33.9	++	5	13	3.0	60.0
CMC-16	8	8	35.1	++	3	23	1.0	33.3
Total	128	121	32.7		89	301	3.1	47.2

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.

Table 53-4. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 42g x 2g

medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of mature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	8	8	35.0	+	0	4	0.0	-
CMC-2	8	7	30.3	-	0	0	0.0	-
CMC-3	8	7	33.3	±	0	2	0.0	-
CMC-4	8	8	34.5	+	0	1	0.0	-
CMC-5	8	8	33.9	±	1	3	0.5	0.0
CMC-6	8	8	31.4	±	0	3	0.0	-
CMC-7	8	8	31.5	±	0	1	0.0	-
CMC-8	8	7	33.9	-	0	0	0.0	-
CMC-9	8	8	32.1	±	0	3	0.0	-
CMC-10	8	8	33.9	++	3	3	1.6	66.7
CMC-11	8	8	33.8	++	0	4	0.0	-
CMC-12	8	7	33.6	+++	0	4	0.0	-
CMC-13	8	7	31.3	-	0	2	0.0	-
CMC-14	8	7	33.1	++	1	3	0.6	0.0
CMC-15	8	8	33.3	++	0	3	0.0	-
CMC-16	8	8	32.3	+++	0	3	0.0	-
Total	128	122	33.8		5	39	0.3	60.0

1): Refer to Table 56.

の8個の子房を植之込んだ。莢の長さは、

$2x \times 2x$ 2" 39.5 mm, $2x \times 4x$ 2" 37.3 mm, $4x \times 4x$ 2"

32.7 mm, $4x \times 2x$ 2" 33.8 mm 2" あり, $2x \times 2x$ が

最も長く, 次" 2" $2x \times 4x$ 2", $4x \times 4x$ が最も短

かかった。切り口からのカルス形成はココナ

ットミル7とカゼイニ酸分解物の添加量が増

すにつれて良くなつてゐたが, 其の傾向は

$4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の組合せにありてはつきりし

てゐた。種子形成は, 十分に発達したと思わ

れる種子と, 受精後或る程度発達したはしたが,

発育の途中で止んでしまつた未熟種子とに分け

て調査した。 $2x \times 2x$ にありて最も良" 種子形

成がみられた。基本培地だけの実験にあり

ても28粒得られ, 17.5%の着粒率のみられた。

11すれの実験にありても十分に発達した種

子が得られた。20%以上の着粒率をみた実験

は CMC-3, -7, -8, -12, -15 と -16 の6区であつた。

特に CMC-16 では1莢6粒以上の種子が形成さ

れた。全体で得られた種子は419粒であつた。

$4x \times 4x$ では基本培地の CMC-1 で15粒, 8.9% の

着粒率であつた。着粒率が3%以上の実験区は、CMC-1, -3, -5, -6, -7, -10と-15と7区であつた。成熟種子は全体で89粒で、未熟種子は301粒であつた。2x x 4xで得られた種子は7粒(CMC 7, -9, -12, -15)で、このうち発芽して3倍粒の雑種性を示したものが2粒であつた。未熟種子については、各実験区において多量にみられ、合計352粒であつた。これに対し4x x 2xでは成熟種子を5粒(CMC-5, -10, -14)得た。未熟種子は39粒と僅かであつた。得た5粒の種子のうち2個体が発芽して生育した。

得られた交雑種子(図14)とそれから発芽した植物体を鉢植之にして育てた(図15)。雑種の検定は各個体の形態と花粉の細胞とで行つた。形態的にみると、葉の先端は丸味を帯び、表面に僅かに毛があり、厚味があつた。概略的に示すと表54のようであつた(表54)。

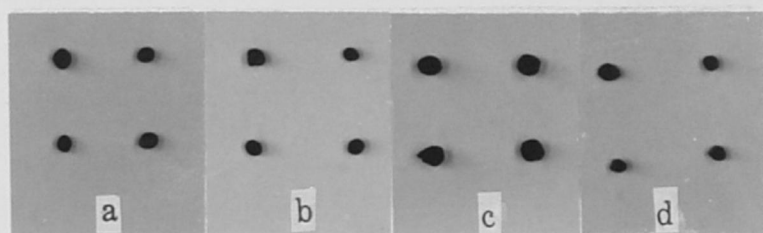


Fig. 14. Hybrid seeds produced by ovary culture. a: $2x \times 2x$, b: $2x \times 4x$, c: $4x \times 4x$, d: $4x \times 2x$.

Table 54. Morphology of leaves of the hybrid plants obtained from ovary culture

Plant	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Leaf surface		Ploidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Rough	Smooth	
$2x \times 2x$		*		*		*	$2x$
$4x \times 4x$	*		*		*		$4x$
$2x \times 4x$		*	*			*	$3x$
$2x \times 4x$		*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$		*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$		*	*			*	$3x$



Fig. 15. Hybrid plants obtained from ovary culture. a: Diploid B. campestris ssp. chinensis (L.) Makino. b: Autotetraploid B. campestris ssp. pekinensis (Lour.) Olsson. c and d: Two F_1 hybrid from the cross, $2x \times 4x$.



e and f: Two F_1 hybrids from the cross,
 $4x \times 2x$.

(V) 子房の人工培養による新型ナ
 プスの育成

冒頭に述べたように B. oleracea 群と B. campestris 群には多くの亜種が存在し、形態的に多様性に富んでいる。そして B. napus は表えのように B. oleracea と B. campestris の異質倍數体であるので、B. oleracea と B. campestris の交雑に

よる人為合成が試みられてきた。B. napus の人為合成は初めは U (1935) によつて行なわれ、ついで Mizushima (1950), Rudorf (1950), Koch and Peters (1953), Hoffmann and Peters (1953), Hosoda (1961), Nishi et al. (1962), Sarashima (1964) 等によつてなされた。しかし人為的にナパス型を造り出すための B. oleracea 群と B. campestris 群の交雑成功率は極めて低く、そのためお互いに似し数の花を交配しなければならぬ。

Håkansson (1956) は B. oleracea と B. campestris の間の不稔現象を組織学的な観察によつて追求している。これによると、B. campestris x B. oleracea においては、胚の発達は "pre-heart" 型まで生長して止つてしまい、逆交配の B. oleracea x B. campestris においては、胚の発達は "heart" 型まで発達して止つてしまい、種子の崩壊が起る。これは先述した2倍体 B. campestris と同質4倍体の間の正逆交雑においてみられる種子崩壊の現象と類似している。B. campestris の2倍体と同質4倍体との間の正逆交雑では、

ず此の場合においても大概の胚は球型まじしか発達しなかつた。このように受精後の胚発生が発達初期で止まってしまう場合には、これらの胚・胚珠または子房を交配後短時間のうちに切り取って人工培養し、雑種植物を得る方法を研究し、或る程度の成功を得ることを果たした(Inomata 1968, III-A-(2)-(iv) 参考)。

本実験では前章の実験に基づいて種々の B. oleracea 群および B. campestris 群の植物を用いて、ふつうの方法では困難な交雑を成功させ、種々の異質倍数体 B. napus を人為的に育成するための基礎的データを得ることを試みた。よってその結果を述べる。

方 法

B. oleracea 群と B. campestris 群の栽培品種を用いて交雑を行なった。それらを表すに示す。これらの品種の人為的自家授粉と B. oleracea 群品種と B. campestris 群品種との間の正逆交雑を行

なつた。用ゝた交配方法はずでに方法の項で述べたとおりである。これ等の実験は1969年と1970年の両年度にわたって行なつた。

子房の人工培養に用ゝた基本培地は、1969年度の実験では Nitsch (1951) のものがあり、1970年度の実験では White (1963) のものがある(表55)。これらの基本培地1ℓあたりグリシン15mg, ナイアシン2.5mg, サイアミン0.5mg, ピリドキシン0.5mg, 蔗糖50g, 魯天末9gを添加した。pHはN-HClとN-KOHを用ゝ高圧殺菌前には5.8~6.0に調整した。その他の点はⅢ-A-(2)-(iv)に述べたと同じである。

Table 55. Composition of the White's mineral solution used for the culture

Inorganic salts	Milligrams per 1000 ml	Inorganic salts	Milligrams per 1000 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	720.0	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	2.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	300.0	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.0
Na_2SO_4	200.0	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0
KNO_3	80.0	H_3BO_3	1.5
KCl	65.0	KI	0.75
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.5		

子房の人工培養に当っては上記の培地に種々の栄養物を添加した。前二節で述べた研究結果から、ナプス型の雑種育成に用いた培地のうち、1969年度のものを表56に、1970年度に行なったものを表57と表58にそれぞれ示した(表56, 57, 58)。

Table 56. Composition of media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate and used for ovary culture

Casein hydrolysate (mg/l)	Coconut milk (%)		
	0	10	20
0	1	2	3
300	4	5	6

Table 57. Composition of media supplemented with casein hydrolysate and yeast extract and used for ovary culture

Casein hydrolysate (mg/l)	Yeast extract (g/l)		
	0	2	5
0	1	2	3
300	4	5	6
500	7	8	9
1000	10	11	12

Table 58. Composition of media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate and used for ovary culture

Casein hydrolysate (mg/l)	Coconut milk (%)		
	0	10	20
0	1	2	3
500	4	5	6

Table 59. Cross combinations used in ovary culture for producing interspecific hybrids

Year	<u>B. campestris</u> cultivar	<u>B. oleracea</u> cultivar	Reference
1969	Hatana	Succession	Figs. 56, 60-1, 61
	Nozaki-hakusai	Nakano-wase	Figs. 56, 60-1, 62
	Kanamachi-kokabu	Nakano-wase	Figs. 56, 60-2, 63
1970	Nozaki-hakusai	Nozaki-wase	Figs. 57, 60-2, 64
	Kyoto-hakusai	Nakano-wase	Figs. 58, 60-3, 65
	Wase-komatsuna	Nozaki-chusei	Figs. 58, 60-3, 66
	Nikanme-taina	Succession	Figs. 58, 60-4, 67

表56, 57, 58の培養に用いた交配組合せの栽培品種名を表59に示す(表59)。

交配後4日目の子房を9%サラミ粉水で消毒後、蔗糖50g/lと含有殺菌水で5回洗浄し、試験管に植えた。培養条件および培養子房についての種々の調査の方法は前述のものと同一である。

本実験のうち表62, 64, 65, および67に示したもののから、收穫時の莢の中には交配種子の代りに直接珠柄に附着した発芽状態の成熟胚が多数得られた。これらの胚と無蓋的にWhite (1963)の培地に移し、1000ルクスの光の下で生育させ、本葉の展開と発根を待つと鉢に移し、生育した際の形態を観察するとともに、根端細胞または、PMCを用いて染色体数を決定した。

結 果

培養当初における子房の長さ

Table 60-1. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 1. Hatana and Succession		
Hatana x Hatana	10	24.9
Hatana x Succession	10	39.0
Succession x Succession	10	28.3
Succession x Hatana	10	29.3
No. 2. Nozaki-hakusai and Nakano-wase		
Nozaki x Nozaki	10	18.6
Nozaki x Nakano	10	17.9
Nakano x Nakano	10	27.1
Nakano x Nozaki	10	27.9

子房の人工培養

に つ り 2 の 結 果 の
う ち , 植 え 込 み 時

の 子 房 の 長 さ を き
と め て 表 60 に 示 す

(表 60) 。 表 60 の

NO. 1 か ら NO. 3 ま で

は 1969 年 度 の 実 験

で あ り , NO. 4 か ら

NO. 7 ま で は 1970

年 度 に お け る 実 験

で あ る 。 NO. 1 に お

い て は 畑 菜 の 自 殖

が 最 も 短 か く , 畑

菜 に サ ク セ ッ シ ョ

と を 交 配 し た も の

が 最 も 長 か っ た。

そ の 差 異 は 約 15mm

あ っ た。 サ ク セ ッ シ ョ と を 母 体 に 用 いた 場 合
は , い ず れ も 同 い 長 さ を 示 し た。 NO. 2 に お

Table 60-2. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 3. Kanamachi-kokabu and Nakano-wase		
Kokabu x Kokabu (10個体)	10	36.4
Kokabu x Nakano (10個体)	10	21.6
Nakano x Nakano (10個体)	10	26.1
Nakano x Kokabu (10個体)	10	25.1
No. 4. Nozaki-hakusai and Nozaki-wase		
Hakusai x Hakusai (20個体)	20	15.1
Hakusai x Wase (20個体)	20	17.3
Wase x Wase (20個体)	20	16.4
Wase x Hakusai (20個体)	20	15.5

いては、白菜を♀オにした場合にはキャベツを♀オにした場合よりも短かく、約10mmの差異がみられた。

NO.3 の場合には、金町小燕を♀オにしたときには、NO.1 の場合の逆で、

金町小燕を自殖した場合のオがキャベツを父オに用いたものよりも15mm長かった。しかしキャベツを♀オにしたものではほぼ同じ長さを示した。

NO.4 においては20個体調べた。いずれの組合せにおいても子房の大きさに大した変りはみ

Table 60-3. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 5. Kyoto=hakusai and Nakano-wase		
Kyoto x Kyoto	10	18.9
Kyoto x Nakano	10	20.8
Nakano x Nakano	10	17.5
Nakano x Kyoto	10	16.4
No. 6. Wase-komatsuna and Nozaki-chusei		
Komatsuna x Komatsuna	10	21.1
Komatsuna x Nozaki	10	14.6
Nozaki x Nozaki	10	24.2
Nozaki x Komatsuna	10	18.8

られなかつた。

NO. 5 においては、
キヤベツに白菜の
花粉を交配したも
のが一番短かく約
5mm 一番長い組合

せのものより短か

つた。NO. 6 の交配

組合せにおいては

小松菜とゆてにし

て野崎中世と花粉

親としたものが最

も短かく、最も長

い組合せと較べ

約 10mm も短か

つた。NO. 7 にお

いては、サクセツ

シヨン x 体菜の組

み合せが一番短かかつたが、それ以外は、
れも同じ長さを示した。

Table 60-4. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	
No. 7. Nikanme-taina and Succession			<u>ナプス型雑種を得るための子房の人工培養</u>
Taina x Taina	10	18.6	<u>工培養</u>
Taina x Succession	10	17.0	子房の培養によるナプス型雑種育成の結果と、交配組み合わせの違いによつて、表61, 62, 63, 64, 65, 66,
Succession x Succession	10	18.4	
Succession x Taina	10	14.4	

67 に示す(表61, 62, 63, 64, 65, 66, 67)。

表61は畑菜とサクセツシヨニについての結果であつて、表61-1は畑菜を母オにして畑菜の交配とサクセツシヨニの交配を示し、表61-2はサクセツシヨニを母オにしてサクセツシヨニ或いは畑菜の交配結果を示した。植込んだ子房の数は畑菜と母オに用いたときは平均10個体であつたが、サクセツシヨニと母オに用いたものは、サクセツシヨニと交配

Table 61-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Hatana and B. oleracea cv. Succession

Cross	Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
<u>Hatana</u> x <u>Hatana</u>	1	10	10	37.7	—	0	0	0.0	—
	2	10	10	40.8	—	0	1	0.0	—
	3	10	10	38.6	—	0	2	0.0	—
	4	10	10	38.2	—	0	0	0.0	—
	5	10	10	37.5	—	0	0	0.0	—
	6	9	8	37.3	—	0	0	0.0	—
Total		59	58	38.4	—	0	3	0.0	—
<u>Hatana</u> x <u>Succession</u>	1	10	10	54.4	—	1	1	0.3	0.0
	2	10	10	57.9	—	0	1	0.0	—
	3	10	10	56.0	—	0	2	0.0	—
	4	10	10	52.9	—	0	4	0.0	—
	5	10	9	53.8	—	0	0	0.0	—
	6	10	10	54.6	—	0	0	0.0	—
Total		60	59	54.9	—	1	8	0.06	0.0

1): Refer to Table 56.

Table 61-2.

Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Hatana and B. oleracea cv. Succession

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seeds set (%)	Seed germination (%)
Succession x Succession	1	4	4	47.8	-	6	0	5.0	100
	2	5	5	44.8	++2)	0	0	0.0	-
	3	4	4	42.8	+++2)	2	0	1.7	100
	4	4	4	35.5	±	2	0	1.7	100
	5	6	6	42.7	+++2)	3	0	1.7	100
	6	5	5	54.0	+++2)	1	0	0.7	100
Total		28	28	45.0		14	0	1.7	100
Succession x Hatana	1	7	7	42.4	-	0	2	0.0	-
	2	9	9	50.2	++2)	0	4	0.0	-
	3	9	9	48.2	+++2)	0	5	0.0	-
	4	10	10	53.9	-	0	3	0.0	-
	5	9	9	53.4	+++2)	0	0	0.0	-
	6	10	10	49.0	+++2)	0	3	0.0	-
Total		54	54	51.7		0	17	0.0	-

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.

Table 62-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Nozaki-hakusai and B. oleracea cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nozaki-hakusai x Nozaki-hakusai	1	100	10	27.6	-	8	9	3.3	50.0
	2	100	10	29.1	+	2	8	0.8	100
	3	100	10	32.8	±	8	17	3.3	61.1
	4	100	9	27.0	-	7	2	3.2	57.1
	5	100	10	27.7	+	3	7	1.3	100
	6	100	10	34.1	±	8	8	3.3	87.5
Total		600	59	29.8		36	51	2.5	69.4
Nozaki-hakusai x Nakano-wase	1	100	8	29.6	-	0	6 ²⁾	0.0	-
	2	100	10	31.9	+	0	4 ²⁾	0.0	-
	3	100	10	29.6	+	0	1 ²⁾	0.0	-
	4	100	10	28.7	-	0	8 ²⁾	0.0	-
	5	90	9	28.7	±	0	0	0.0	-
	6	100	10	27.0	++	0	1	0.0	-
Total		590	57	29.4		0	20	0.0	-

1): Refer to Table 56.
2): Immature embryo showing no seed forming.

Table 62 -2.

Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Nozaki-hakusai and *B. oleracea* cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seeds set (%)	Seed germination (%)
Nakano-wase x Nakano-wase	1	10	10	51.4	-	0	0	0.0	-
	2	10	10	55.2	+	0	0	0.0	-
	3	10	10	53.5	+++	0	3	0.0	-
	4	9	9	54.9	±	2	0	0.7	100
	5	10	10	53.9	+++	0	1	0.0	-
	6	10	9	52.0	+++	0	1	0.0	-
Total		59	59	52.6		2	5	0.1	100
Nakano-wase x Nozaki-hakusai	1	10	10	53.8	-	0	9	0.0	-
	2	10	10	52.8	+++	0	12	0.0	-
	3	10	8	51.3	+++	0	7	0.0	-
	4	10	10	49.0	-	0	13	0.0	-
	5	10	10	52.4	+++	0	4	0.0	-
	6	10	10	54.1	+++	0	8	0.0	-
Total		60	58	51.4		0	53	0.0	-

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.

(195)

196

したもので平均4.6個、烟草を交配したもので9個体であった。收穫時における莢の長さは実験区による相違よりも交配組合せの内の相違のものが大きく、各区の莢の長さの平均は、烟草の自殖で38.4mm、烟草×サクセツニヨニで54.9mm、サクセツニヨニの自殖で45.0mm、サクセツニヨニ×烟草で51.7mmであった。切り口からのカルス形成は、烟草ではみられなかったが、サクセツニヨニを母体にしたものでは、ココナットミルクを10%あるいは20%培地に添加した場合に、著しいカルス形成がみられ、そこから根の発生も観察された。得られた種子は烟草の自殖でも1粒の種子も得られなかったが、サクセツニヨニの自殖においては14粒得られた。正交交雑においては、烟草×サクセツニヨニで1粒得られただけであった。サクセツニヨニの自殖において、培養基組成のちがいによる種子形成の差異ははっきりみられなかった。得られた種子の発芽率は良かった。

(197)

表62は野崎白菜と中野早生の結果で、表62-1は野崎白菜を母オに用いて、それに野崎白菜と中野早生を交配したものであり、表62-2は中野早生を母オにして、中野早生と野崎白菜とそれぞれ交配したものである。植えこんだ子房の数はそれぞれの交配組合せにおいて平均10個体であった。各交配組合せによる平均の莢の長さは、野崎白菜の自殖で29.8mm、野崎白菜×中野早生で29.4mm、中野早生の自殖で52.6mm、中野早生×野崎白菜で51.4mmであり、傾向を示した。切り取った切り口に生じるカルス形成の割合を平均してみると、野崎白菜の場合はココナツトミルウ添加区で僅かに良好であった。一方中野早生の場合には、ココナツトミルウ添加区におけるカルス形成は非常に良く、そこから発根もみられた。得られた種子は野崎白菜では成熟種子が計36粒、未熟種子5粒であったが、中野早生では2粒の成熟種子しか得られず、未熟種子もほとんどみられなかった。正逆交

雑の野崎白菜 × 中野早生 において、成熟した種子は1粒も得られなかったが、未熟種子の中には種皮のみとれない、胚だけ発達した状態で珠柄に付着してゐるものがみられた。それら付着してゐる胚の発達程度は、表63には未熟種子としてまとめられたが、その発達程度は色々あつて最も良く発達したものは、ほとんど成熟に近いものであつた。最も発達の悪い胚は "torpedo" 型であつた。逆交雑の中野早生 × 野崎白菜 では、未熟種子が多数みられたが、みな著しく萎縮してゐて、胚のみ発達してゐるものも認められなかった。得られた種子の発芽は良かった。

表63は金町小燕と中野早生の結果で、表63-1は金町小燕と母方に用いて、それに金町小燕と中野早生と交配したものであり、表63-2は中野早生と母方にして、中野早生と金町小燕とそれぞれ交配したものである。植ふごんば子房の平均数は各組合せについて10個体であつた。收穫時における莢の長さは各

Table 63-1.

Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Kanamachi-kokabu and B. oleracea cv. Nakano-wase

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Kanamachi-kokabu	10	10	44.4	-	2	4	0.7	100
x	10	10	47.1	+	3	1	1.1	100
Kanamachi-kokabu	10	10	45.1	±	0	4	0.0	-
x	10	10	44.7	-	7	6	2.5	71.4
Kanamachi-kokabu	10	10	43.9	+	0	2	0.0	-
x	10	10	44.6	+	0	1	0.0	-
Total	60	59	45.0		12	18	0.7	75.0
Kanamachi-kokabu	10	10	25.6	-	0	0	0.0	-
x	10	10	26.3	-	0	0	0.0	-
Nakano-wase	10	10	26.1	-	0	0	0.0	-
x	10	10	27.4	-	0	0	0.0	-
Nakano-wase	10	10	27.4	-	0	0	0.0	-
x	10	10	23.4	-	0	0	0.0	-
Total	60	60	26.4		0	0	0.0	-

1): Refer to Table 56.

2): Roots were fromed from the callus.

Table 65-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Kanamachi-kokabu and B. oleracea cv. Nakano-wase

Cross	Media ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nakano-wase	1	10	10	48.1	-	8	3	2.7	100
	2	10	9	43.6	-2)	0	2	0.0	-
	3	10	10	44.3	±2)	3	3	1.0	0.0
	4	10	10	51.2	-	3	1	1.0	66.7
	5	10	10	43.6	±2)	2	3	0.7	100
	6	10	10	44.4	±2)	2	2	0.7	100
Total		60	59	45.9		18	14	1.0	77.8
Nakano-wase	1	10	8	46.4	±2)	0	1	0.0	-
	2	10	9	46.2	±2)	0	1	0.0	-
	3	10	10	46.2	±2)	0	0	0.0	-
	4	10	10	44.8	-	0	2	0.0	-
	5	10	10	49.6	±2)	0	2	0.0	-
	6	10	8	46.0	+++2)	0	2	0.0	-
Total		60	55	46.6		0	8	0.0	-

1): Refer to Table 56.
2): Roots were formed from the callus.

Table 64-1. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. campestris cv. Nozaki-hakusai

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	15	15	24.1	-	10	29	2.8	80.0
2	15	14	24.6	-	12	16	3.6	33.3
3	15	13	23.0	-	6	20	1.9	16.7
4	15	14	22.4	-	7	11	2.1	42.9
5	15	14	26.1	-	11	22	3.3	45.5
6	15	14	26.3	-	5	38	1.5	40.0
7	12	11	27.7	-	7	7 ²⁾	2.7	57.1
8	12	12	30.3	-	6	11	2.1	50.0
9	12	10	30.1	-	1	9	0.4	0.0
10	12	10	26.0	-	7	16	2.9	28.6
11	10	10	31.2	-	4	16	1.7	50.0
12	11	10	28.7	-	3	12	1.3	33.3
Total	159	147	26.8	-	79	197	1.9	44.3

1): Refer to Table 57.

2): Immature embryo showing no seed forming.

Table 64-2. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. campestris cv. Nozaki-nakusai x B. oleracea cv. Nozaki-wase

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	12	12	21.7	-	6 ²⁾	5 ³⁾	2.1	-
2	12	12	23.4	-	4 ²⁾	3 ³⁾	1.4	-
3	12	12	20.5	-	3 ²⁾	1 ³⁾	1.0	-
4	12	11	19.7	-	9 ²⁾	11 ³⁾	3.4	-
5	12	12	19.7	-	4 ²⁾	2 ³⁾	1.4	-
6	12	11	20.3	-	1 ²⁾	0	0.4	-
7	10	10	18.0	-	0	2	0.0	-
8	10	10	15.0	-	0	0	0.0	-
9	10	9	19.4	-	2	5	0.9	50.0
10	10	10	16.6	-	2 ²⁾	1	0.8	-
11	10	10	19.9	-	3	8	1.3	100
12	10	10	15.9	-	1	1	0.4	100
Total	132	129	19.8	-	35	39	1.0	83.3

- 1): Refer to Table 57.
 2): Mature embryo showing no seed formation.
 3): Immature embryo showing no seed formation.

Table 64-3. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. oleracea cv. Nozaki-wase

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	5	4	24.0	-	0	0	0.0	+
2	5	5	30.6	+	0	2	0.0	+
3	5	5	29.8	+	0	0	0.0	-
4	5	5	31.2	++	0	0	0.0	-
5	5	4	24.5	-	0	0	0.0	-
6	6	6	27.0	-	1	3	0.6	0.0
7	5	5	30.8	+	1	0	0.7	0.0
8	5	5	33.0	+	0	0	0.0	-
9	5	5	21.2	+	1	0	0.7	0.0
10	5	5	28.8	+	0	0	0.0	-
11	5	5	31.2	+	0	0	0.0	-
12	5	5	23.4	-	0	0	0.0	-
Total	61	59	28.5		3	5	0.2	0.0

1): Refer to Table 57.

Table 64-4. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. oleracea cv. Nozaki-wase x B. campestris cv. Nozaki-hakusai

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	5	4	20.5	-	0	0	0.0	-
2	5	4	24.0	-	0	0	0.0	-
3	4	4	26.8	-	0	0	0.0	-
4	5	5	36.4	++	0	0	0.0	-
5	5	5	24.0	-	0	1	0.0	-
6	4	4	17.8	-	0	0	0.0	-
7	13	13	29.8	-	0	0	0.0	-
8	13	11	24.0	-	0	0	0.0	-
9	13	11	26.1	+	0	0	0.0	-
10	13	13	33.2	-	0	0	0.0	-
11	14	13	25.5	-	0	0	0.0	-
12	14	14	28.0	-	0	0	0.0	-
Total	108	101	27.2		0	1	0.0	-

1): Refer to Table 57.

と平均してみると、金町小燕の自殖が 45.0mm 、金町小燕 \times 中野早生が 26.0mm 、中野早生の自殖が 45.9mm 、中野早生 \times 金町小燕が 46.6mm であった。金町小燕 \times 中野早生の組合せにおいては他と較べて著しく莢の発達が悪かった。カルスの形成については変異の中が大きく、発根はカルス形成の良好なものからみられた。中野早生を母系に用いた場合のカルス形成はコナットミルグの濃度と関係があるように思えた。種子形成は、対照区として自殖したものでは同程度の割合であったし、その種子の発芽率も高かった。種間交配においては、いずれの場合も成熟種子は得られなかった。

表64は野崎白菜と野崎早生の結果で、培地組成はイースト抽出物とカゼイン分解物を用いた表57の組合せを用いた。

表64-1は野崎白菜の自殖の結果を示し、表64-2は野崎白菜 \times 野崎早生、表64-3は野崎早生の自殖、表64-4は野崎早生 \times 野崎白菜の結果とそれぞれ示した。収穫時における

莢の平均の長さば、野崎白菜の自殖で 26.8mm 、
 野崎白菜 \times 野崎早生で 19.8mm 、野崎早生の
 自殖で 28.5mm 、野崎早生 \times 野崎白菜で 22.2
 mm であつた。植えこんだ時の平均子房の大
 ささの一番短かつた野崎白菜の自殖は、野崎
 早生の自殖に次いで長く、植えこむ時に一番
 長かつた野崎白菜 \times 野崎早生は一番短かつた
 切り口におけるカルスの形成は白菜とオネに
 用いたものではまづたぐみえれなかつたが、
 キャベツ（野崎早生）とオネに用いたものでは
 若干みられた。得られた種子は野崎早生の
 自殖では成熟種子 3 粒、未熟種子 5 粒で種子
 稔性が非常に低かつたが、野崎白菜の自殖で
 は成熟種子 29 粒、未熟種子 19 粒が得られ、
 非常に高い種子稔性を示した。この場合の種
 子形成を培地別にみえみると、カゼイニ酸分
 解物 $300 \sim 500\text{mg/l}$ が有効であり、イースト
 抽出物は 2g/l まではよく、それ以上の濃度
 ではかえつて種子形成率が低下した。得られ
 た種子の発芽率は 50% 前後であり、余り良好

2 はなかった。種間交雑の野崎白菜×野崎早生においては、種子から発芽したように発達した胚が、珠柄に付着してゐるのが多数みられ、種皮は全くなかった。これ等の胚を收穫時に無菌的に取り出して、white の培地に移し、1000 ルクス連続照射、25°C の条件下で育った。また未熟種子の中には、珠柄に胚だけが付着してゐるものもあったが、これらの胚は発達が必要で、"torpedo" 型から "late torpedo" 型のものがあった。野崎白菜の自殖の培地番号 No. 9 の未熟種子においても、7 粒のうち 5 粒は胚のみ発達したものであり "torpedo" 型から "late torpedo" 型であった。交雑種子は 6 粒得られ、うち 5 粒が発芽した。これに反して逆交配の野崎早生×野崎白菜においては、1 粒の種子も得られず、また未熟種子も存在しなかった。

表 65 は京都白菜と中野早生の結果であり、表 58 の培地組成に植えたものから得られたものである。表 65-1 は京都白菜を母系にして、

Table 65-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolyzate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Kyoto-hakusai and B. oleracea cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Kyoto-hakusai	1	10	10	22.3	-	0	18	0.0	-
x	2	10	10	25.9	-	3	2	1.3	33.3
Kyoto-hakusai	3	10	10	25.5	-	1	14	0.4	100
x	4	10	10	27.3	-	5	26	2.1	20.0
Kyoto-hakusai	5	10	9	26.7	-	0	12	0.0	-
Total	6	10	8	24.9	-	4	10	1.7	75.0
Kyoto-hakusai	1	60	57	25.4	-	13	82	0.7	46.2
x	2	10	10	20.5	-	1 ³⁾	2 ⁴⁾	0.4	-
Kyoto-hakusai	3	10	10	24.8	-	1 ³⁾	0	0.4	-
x	4	10	10	22.5	- ²⁾	0	0	0.0	-
Nakano-wase	5	10	10	25.9	-	2	2	0.8	0.0
Total	6	10	10	25.4	±	1 ³⁾	2 ⁴⁾	0.4	0.0
Total		60	60	23.7		6	6	0.4	0.0

- 1): Refer to Table 58.
 2): Roots were formed from the callus.
 3): Mature embryo showing no seed formation.
 4): Immature embryo showing no seed forming.

Table 65-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Kyoto-hakusai and *B. oleracea* cv. Nakano-wase

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nakano-wase x Nakano-wase	1	10	42.1	-	6	3	2.0	16.7
	2	10	37.3	-2)	6	2	2.0	16.7
	3	10	39.7	±2)	9	1	3.0	22.2
	4	10	41.1	-	9	1	3.0	11.1
	5	10	33.5	+2)	9	5	3.0	11.1
	6	10	37.4	+2)	3	2	1.0	33.3
Total	66	60	38.5		42	14	2.3	16.7
Nakano-wase x Kyoto-hakusai	1	10	36.4	±	0	1	0.0	-
	2	10	43.5	+2)	0	1	0.0	-
	3	10	40.7	+2)	0	2	0.0	-
	4	10	43.2	+2)	0	6	0.0	-
	5	10	38.9	+2)	0	1	0.0	-
	6	10	36.9	++	0	1	0.0	-
Total	60	60	39.8		0	12	0.0	-

1): Refer to Table 58.
2): Roots were formed from the callus.

Table 66-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolyzate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Wase-komatsuna and B. oleracea cv. Nozaki-chusei

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Wase-komatsuna	1	19	10	41.6	—	9	46	4.1	0.0
	2	10	10	42.1	—	1	31	0.5	100
	3	10	9	39.9	—	1	18	0.5	0.0
Wase-komatsuna x	4	19	8	41.4	—	11	29	6.3	54.5
	5	10	10	40.4	—	2	42	0.9	0.0
komatsuna	6	10	9	41.3	—	3	36	1.0	0.0
Total		60	56	41.1	—	27	202	2.2	25.9
Wase-komatsuna	1	10	10	23.8	—	0	0	0.0	—
	2	10	10	25.8	—	0	0	0.0	—
	3	10	9	23.6	—	0	0	0.0	—
Wase-komatsuna x	4	10	10	25.6	—	0	0	0.0	—
Nozaki-chusei	5	10	9	23.4	—	0	0	0.0	—
	6	10	10	24.9	—	0	0	0.0	—
Total		60	58	24.6	—	0	0	0.0	—

1): Refer to Table 58.

Table 66-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Wase-komatsuna and B. oleracea cv. Nozaki-chusei

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nozaki-chusei x Nozaki-chusei	1	10	42.1	-	0	3	0.0	-
	2	10	40.2	++ ²⁾	1	0	0.3	0.0
	3	10	39.3	++	0	0	0.0	-
	4	10	38.9	-	0	1	0.0	-
	5	10	35.6	++	1	0	0.3	-
	6	10	36.8	++ ²⁾	0	1	0.0	-
Total	60	60	38.8		2	5	0.01	0.0
Nozaki-chusei x Wase-komatsuna	1	10	28.8	+	0	0	0.0	-
	2	10	31.6	++	0	0	0.0	-
	3	10	28.6	+++	0	0	0.0	-
	4	10	30.0	±	0	0	0.0	-
	5	10	26.6	++	0	0	0.0	-
	6	10	30.1	+++ ²⁾	0	0	0.0	-
Total	60	60	29.3		0	0	0.0	-

1): Refer to Table 58.
2): Roots were formed from the callus.

Table 67-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Nikanme-taina and *B. oleracea* cv. Succession

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nikanme-taina x Nikanme-taina	1	10	10	31.6	-	3	23	1.4	0.0
	2	10	10	27.9	-	0	12	0.0	-
	3	10	9	28.3	-	1	20	0.5	0.0
	4	10	10	30.5	-	3	22	1.4	66.7
	5	10	9	31.2	-	0	18	0.0	-
	6	10	6	27.2	-	0	10	0.0	-
Total		60	54	29.6		7	105	0.6	28.6
Nikanme-taina x Succession	1	10	10	22.9	-	5 ²⁾	0	2.3	-
	2	10	7	22.4	-	3 ²⁾	3 ³⁾	2.0	-
	3	10	10	22.9	-	0	4 ³⁾	0.0	-
	4	10	10	24.3	-	0	8	0.0	-
	5	10	9	22.1	-	0	8	0.0	-
	6	10	10	23.8	-	8 ²⁾	5 ³⁾	3.6	-
Total		60	56	23.1		16	28	1.3	-

- 1): Refer to Table 58.
 2): Mature embryo showing no seed formation.
 3): Immature embryo showing no seed forming.

Table 67-2.

Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Nikanme-taina and B. oleracea cv. Succession

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. length (mm)	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Succession x Succession	1	10	9	36.9	-	2	1	0.7	0.0
	2	10	10	37.4	+++	0	1	0.0	-
	3	10	10	37.0	±	1	3	0.3	0.0
	4	10	10	40.1	-	1	0	0.3	0.0
	5	10	10	36.1	-	1	1	0.3	0.0
	6	10	10	32.8	++	2	1	0.7	0.0
Total	60	59		36.7		7	7	0.4	0.0
Succession x Nikanme-taina	1	10	10	40.7	-	0	1	0.0	-
	2	10	10	34.1	++	0	0	0.0	-
	3	10	10	35.0	++	0	0	0.0	-
	4	10	10	43.1	-	0	0	0.0	-
	5	10	9	38.0	++	0	0	0.0	-
	6	10	10	39.5	++	0	1	0.0	-
Total	60	59		38.4		0	2	0.0	-

1): Refer to Table 58.

2): Roots were formed from the callus.

京都白菜と中野早生と交配したものであり、表65-2は中野早生を母父にして中野早生と京都白菜と交配した結果を示した。平均10個体の子房を植えた。平均の莢の長さは、京都白菜の自殖で25.4mm、京都白菜×中野早生で23.7mm、中野早生の自殖で38.5mm、中野早生×京都白菜で39.8mmであつて、傾母型であつた。カルス形成にうけは、京都白菜を母父したものではほとんどみられなかつたが、中野早生を母父に用いたものは、ココナットミルクを添加した皿において、カルス形成が良くなり、その大部分のものから根が発生してゐた。種子形成については、京都白菜の自殖で13粒、中野早生の自殖で42粒得られた。京都白菜の自殖ではカゼイン酸分解物を添加した場合のものが、種子形成は良かったが、中野早生では差違はなかつた。中野早生においては多数の種子形成がみられたが、発芽率は低く僅か7粒(16.7%)であつた。京都白菜と中野早生の正逆交雑における

種子形成については、京都白菜×中野早生では3粒の交雑種子が得られたが、いずれも不発芽であった。また種子がら発芽したように発芽した胚が、珠柄に付着してゐるものから個体みられた。これ等の胚を収穫時に無菌的に取り出し、whiteの培地に移植した。また未熟種子の中には未発達の胚だけが珠柄に付着してゐるものが見つかった。その発芽状態は"torpedo"型から"late torpedo"型までのものであった。これに対して中野早生×京都白菜では1粒の交雑種子も得られなかったし、未熟種子も僅かに得られただけであった。

表66は早生小松菜と野崎中世の結果で、表66-1は早生小松菜を母系にして早生小松菜と野崎中世と交配したものであり、表66-2は野崎中世を母系にして野崎中世と早生小松菜と交配した結果を示した。平均10個体の子房を各組合せとも植之込んだ。収穫時における葉の平均の長さは、早生小松菜の自殖が一番長く41.1mm、次いで野崎中世の自殖で

38.8 mm, 一番生長の要かつたのは早生小松菜×野崎中世で24.6 mmであつた。カルスの形成は早生小松菜を母ネに用いたものにおい
てはみられなかつたが、野崎中世の場合はコ
ナットミルクの添加により著しいカルス形
成がみられた。早生小松菜と野崎中世の自殖
の種子形成については、2ク粒と2粒と種子が
それぞれ得られた。この発芽率は伯く早生小
松菜でク粒(25.9%)発芽したが、野崎中世
のネは発芽種子は得られなかつた。早生小松
菜と野崎中世の正逆交雑においては、いずれ
の組合せにおいても1粒の種子も得られな
かつた。また未熟種子も全く存在しなかつた。

表67はニ食目体菜とサクセツニヨニの結果
で、表67-1はニ食目体菜を母ネに用いたもの
であり、表67-2はサクセツニヨニを母ネに
用いて、サクセツニヨニとニ食目体菜を花粉
親とした結果である。各組合せも各実験区に
ついては平均10個の子房を植えた。收穫
時における莢の平均の長さはサクセツニヨニ

と母オに用いたものが、ニ食目体菜と母オに
 用いたものより長かった。カルス形成と根の
 発生はニ食目体菜の場合には認められなく、
 サクセツニヨニのオからだけ認められた。ニ
 食目体菜の自殖の発熟種子は僅かク粒で、未
 熟種子は105粒得られた。得られた発熟種子
 ク粒のうち2粒発芽した(28.6%)。サクセ
 ツニヨニの自殖ではク粒の発熟種子が得られ
 たが、いずれも不発芽であった。ニ食目体菜
 とサクセツニヨニとの正逆交雑において、い
 ずれの組合せにおいても発熟種子は得られな
 かった。ニ食目体菜と母オに用いた交配では
 珠柄に胚だけ付着してゐる、発芽種子のよう
 に発達した胚が多数みられた。それらをwhite
 の培地に移植し生育させた。また同じ組合せ
 において未熟種子の中にも胚だけ発達してゐ
 るものが珠柄に付着してゐる未発達の胚がみ
 られた。これらの胚の発達状態は"torpedo"型
 から"late torpedo"型であった。

得られた雑種植物個体

種子から発芽した幼植物のような胚のみが発達し、珠柄に付着してゐたものと無菌的に取り出して white (1963) の培地に移し、連続光の下で培養し、本葉の展開と発根を経て、植木鉢に移植した。この実験の結果を表 68 に示す。雑種は3つの組合せから得られた。野崎白菜 × 野崎早生の組合せからは、試験管から鉢植にするまでは、ほとんど胚を取り出した数と同じであつたが、成体まで育つたものが僅か3個体であつた。京都白菜 × 中野早生では3個体の胚を取り出して、2個体の成育個体を得た。また二食自体菜 × サクセツシヨの組合せからは、18個体の胚を取り出して、生育して開花まで成育したものが12個体と、試験管から植木鉢に植えたときの損失が少なかった。これらの実験から得た雑種植物個体は計19個体である。

white (1963) の培地に移してからの生育に

Table 68. Number of hybrid plants produced by test-tube culture of developing embryos which were found in cultured ovaries

Cross	Medium	No. of embryos cultured	No. of plants transplanted	No. of plants grown
Nozaki-hakusai	1 4)	6	5	1
x	2	4	4	1
Nozaki-wase	3	3	3	0
	4	10	10	3
	5	4	4	0
	6	1	1	0
	10	2	0	-
Total		30	27	5
Kyoto-hakusai	1 2)	1	1	1
x	2	1	1	1
Nakano-wase	6	1	1	0
Total		3	3	2
Nikanme-taina	1 3)	5	5	3
x	2	3	0	-
Succession	3	1	1	1
	6	9	9	8
Total		18	15	12

1): Refer to Table 64-2.

2): Refer to Table 65-1.

3): Refer to Table 67-1.

には、すぐに本葉を出して生育するもの(図16a)、胚軸の伸長だけが著しいもの(図16b)、子葉の中から数重にも子葉が発生してくるもの(図16c)等の変異がみられた。

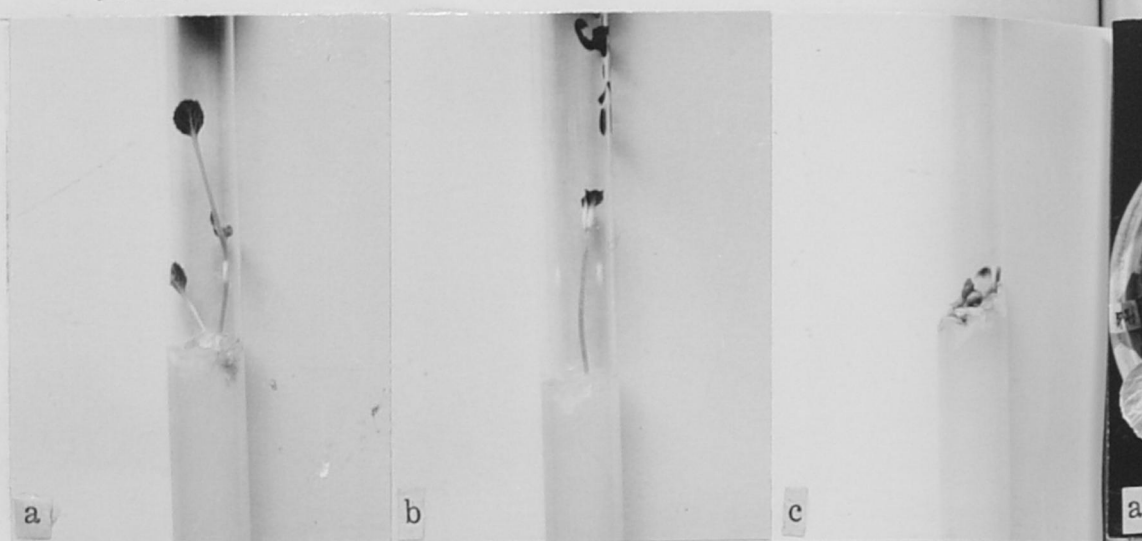


Fig. 16. Test-tube culture of developing embryos, which were formed in cultured ovary.
 a. Plantlet growing normally.
 b. Plantlet showing remarkable growth of hypocotyle.
 c. Plantlet developing many cotyledon-like leaves.

図17は雑種植物体が得られ、親の個体を示したもので、図17aは野崎白菜、図17bは食目体菜で、いずれも母系として用いたものである。図17cは中野早生で花粉親として用いたものである（図17）。

試験管から植木鉢へ移植した発達の途中で、正常に発育を続けるものの他に、生長点が2つ取りはさるゝに分岐するものもみられた。鉢に植えて根の活着が始まると著しい生育を示した（図18a, c, e, g）。これらは成長す

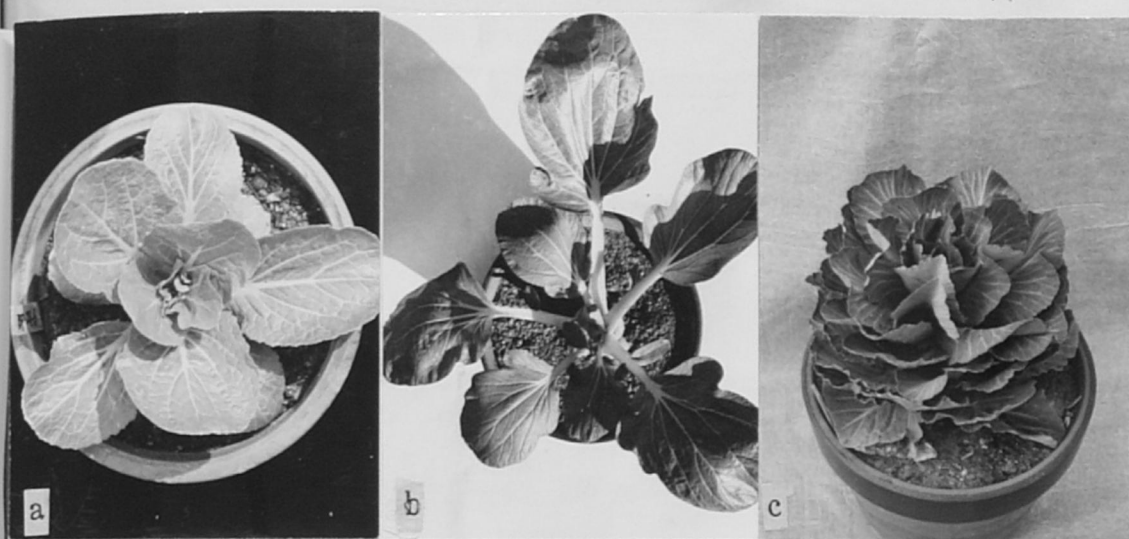


Fig. 17. Maternal plants used in the ovary culture.
 a. *B. campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson cultivar Nozaki-hakusai used as a maternal plant.
 b. *B. campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino cultivar Nikanme-taina used as a maternal plant.
 c. *B. oleracea* L. var. *capitata* L. cultivar Nakano-wase used as a paternal plant.

るに従って、雑種の形態を示した。即ち＝食
 自体菜とサクセツシヨノの中間を示すもの（
 図18b, c）、白菜と野崎早生の中間を示すも
 のとがみられた（図18f, g, i）。体菜とキャ
 ベツの雑種では、葉全体の形は体菜に似てい
 たが、葉の緑はキャベツのように濃緑色を呈
 し、葉は厚かった。12個体生育した個体の中
 での個体変異はなかった。白菜とキャベツの

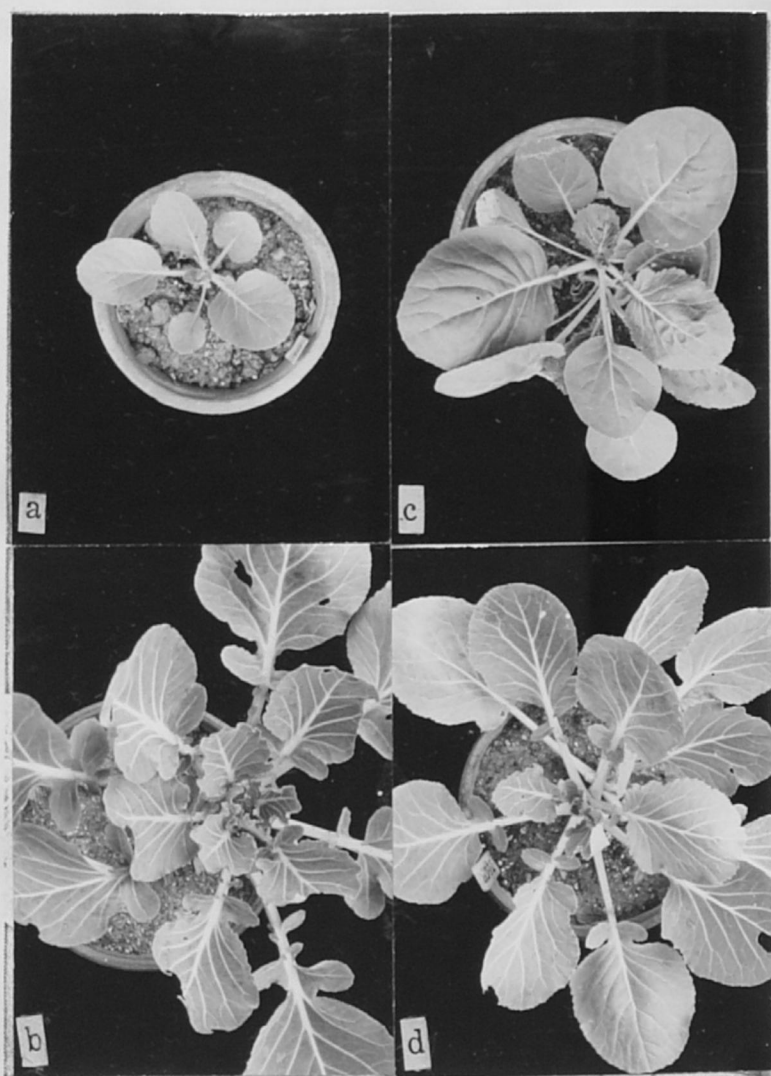
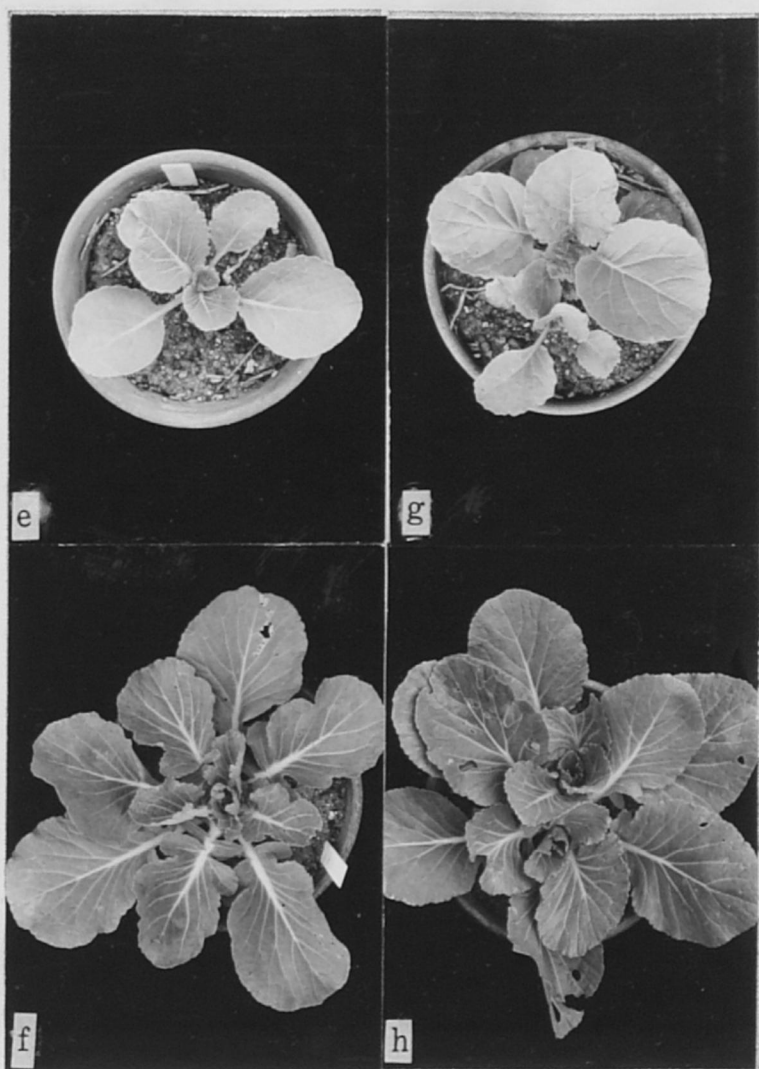


Fig. 18 . Hybrid plants obtained by test-tube culture of developing embryos which were formed in cultured ovary.

- a. Hybrid plantlet of Nikanme-taina x Succession which was transplanted from test tube.
- b. Hybrid plant of Nikanme-taina x Succession which have two growth points.
- c. Hybrid plantlet of Nikanme-taina x Succession which was transplanted from test tube and which have two growth points.
- d. Hybrid plant of Nikanme-taina x Succession which have two growth points.



- e. Hybrid plantlet of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase
 f. Hybrid plant of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase
 g. Hybrid plantlet of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase
 which have two growth points.
 h. Hybrid plant of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase
 which have two growth points.



- i. Another type of hybrid of Kyoto-hakusai x Nakano-wase which has two growth points.



Fig. 19. Chromosome number of hybrid plants ($2n=19$) in the cross between *B. campestris* and *B. oleracea*.

雑種でも、両親の
中間を示した(図
18 f, g, i) がこれ
らの中では形態的
に幾らかの変異が
みられた。葉柄の
ところに着しくく

むれがみられ、
葉の周辺のギ
ザギザが少な
いもの(図18
f)から、葉
全体の形が白
菜に似ている
もの(図18 g)
までみられた。
葉の緑はいず
れの場合にあ
いても濃いき
やべつの形質

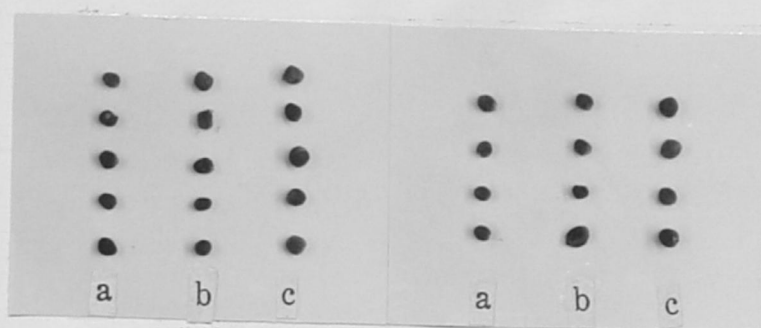


Fig. 20. Hybrid seeds obtained by ovary culture.

- 1a. Seeds of Nozaki-hakusai (control).
- 1b. Hybrid seeds of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase.
- 1c. Seeds of Nozaki-wase (control).
- 2a. Seeds of Kyoto-hakusai (control).
- 2b. Hybrid seeds of Kyoto-hakusai x Nakano-wase.
- 2c. Seeds of Nakano-wase (control).

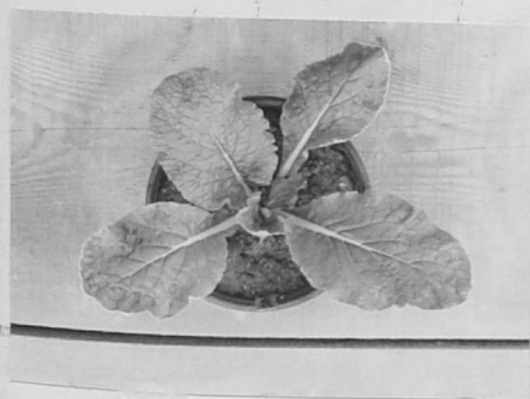


Fig. 21. Hybrid plant obtained from the seed in the cross of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase.

を持ち、葉の厚さも
キャベツのように
厚かった。

得られた植物体の
根端を採り、その
体細胞分裂を観
察した結果、いずれ
もナプス型の染色
体構成をもつ半

数体 ($2n=19$) があつた (図19)。

野崎白菜 × 野崎早生の場合、特に鉢に移植した個体が生育し、成体までになつた例数がすくなくつたのは、後の高塩によるためと思われる。

別に本実験の種間交雑で、野崎白菜 × 中野早生の組合せから5粒、京都白菜 × 中野早生の組合せから4粒の交雑種子を得たのである (図20)。前者の野崎白菜 × 中野早生からの5粒のうち、1粒が発芽した。後は2個体は枯死し、3個体が生長した。これ等は、いずれも同じ形態を示したが、白菜とキャベツの中間というよりも白菜に近い形態を示した (図21)。染色体はまだ観察してゐないので、どのような染色体構成の雑種か不明である。後者の京都白菜 × 中野早生から得られた4粒の種子は、いずれも不発芽であつた。

(3) 交雑不適合性の生理学的研究

(i) 子房の培養条件の検討

植物の組織培養や根などの器官の培養には古くから White (1963), 或いは Heller (Gautheret 1959) の培地が盛んに用いられてきたし, またこれ等を幾分修正した修正 White 或いは修正 Heller の培地も広く使用されてきた。また近年タバコの髓の組織培養により, 今までよりも生育のよい培地で, 無機塩の濃度も高い培地を造り出した (Murashige and Skoog 1962)。これらの無機塩の培地に添加される有機物としては, グリシン, サイアミン, ピリドキシン, ナイアシン, イノシトール, ビオチン等があるが, これらの添加物のうちサイアミンを欠くと, 長期間にわたっての培養が困難であるが, その他は植物の種類によって生育に必要なものとそうでもないものがある (Gautheret 1959)。

これらの研究からは較的無機塩の濃度の低い White の培地, 或いは無機塩濃度の高い Murashige and Skoog の培地等を用いて, Brassica の子房の人工培養にいずれが最も適しているか

を検討すると同時に、添加したアミノ酸、ビタミン類によつて種子形成の変化がみられるかどうかを調べた。

糖濃度については、White, Nitsch, Murashige and Skoog の各培地はサッカロースの濃度が1リットル当り20g, 50g, 30gとそれぞれなつてゐるが、Brassicaの子房の人工培養においてはどの糖濃度が適量であるか、また培養条件としての温度、或いは光の条件によつて種子形成に如何なる変化がみられるかを調べた。

次に今までのBrassicaの子房の培養では、交配後4日目のものを植え込んでゐたが、それ以前、或いは以後についてこの種子形成については未調査である。胚珠培養の成功例とみると、交配後4日から6日目のものの培養例が多い（中島1970）。Brassicaの子房の人工培養において、交配後のいろいろな時期に植物体から切り取つて、人工培養を行ない、その種子形成等について調査した。

材料および方法

実験に用いた材料は二倍体雪白体菜と同質
4倍体野崎白菜²⁾, $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の交配と
行なった。このシリーズの

培養基の無機塩の濃度の違いの実験につ
ては、それぞれ White, Heller, Nitsch と Murashige and
Skoog の培地を用いた。その塩濃度と種類につ
いては表69に示した(表69)。糖濃度その他の
の条件については今までのものと同一条件で、
基本培地に添加したアミノ酸、ビタミン類は
今まで用いた Nitsch の培地に用いていたものの他
に、双子葉植物の組織培養全般について有効
であると知られる Morel (Gautheret 1959) の有機物
をとりかしたものと、その両者と合わせて添
加した区を作った。その培地と添加した種類
と量を表70に示した(表70)。

糖濃度の差異による種子形成の相違をみる
実験には Nitsch の培地に蔗糖を1リットル当り
10g, 30g, 50g, 70g と90g を添加した培地を実

Table 69. Composition of several solutions used for the ovary culture (mg/l)

Medium	Nitsch (1951)	White (1963)	Heller (1953)	Murashige and Skoog (1962)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500	300	-	-
KH_2PO_4	125	-	-	170
KNO_3	125	80	-	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125	720	250	370
Na_2SO_4	-	200	-	-
KCl	-	65	750	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16.5	125	-
NaNO_3	-	-	600	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	75	440
NH_4NO_3	-	-	-	1650
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	2.5	-	-
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	1	-
Fe citrate	10	-	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	3	1	8.6
H_3BO_3	0.5	1.5	1	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3	7	0.1	22.3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.03	0.025
AlCl_3	-	-	0.03	-
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.03	-
KI	-	0.75	0.01	0.83
H_2SO_4	0.5ml	-	-	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	-	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0.025
$\text{Na}_2\text{-EDTA}^*$	-	-	-	37.3
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	-	-	-	27.8

* 5ml/l of a stock solution containing 5.57g FeSO_4 and 7.4g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ per liter of H_2O .

Table 70. Compositions of the media used for the ovary culture

	1*	2	3	4
Nitsch (1951)	N-1	N-2	N-3	N-4
White (1963)	W-1	W-2	W-3	W-4
Heller (1953)	H-1	H-2	H-3	H-4
Murashige and Skoog (1962)	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4

- * 1): Basal medium only.
 2): Basal medium plus thiamine 0.5mg, glycine 15mg, niacin 2.5mg and pyrdoxine 0.5mg (Modified White 1963).
 3): Basal medium plus thiamine 1.0mg, biotin 0.01mg, myo-inositol 100mg and Ca pantothenate 1.0mg (Morel 1948).
 4): Basal medium plus thiamine 1.0mg, glycine 15mg, niacin 2.5mg, pyrdoxine 0.5mg, biotin 0.01mg, myo-inositol 100mg and Ca pantothenate 1.0mg.

実験に供した。

光と温度条件についての実験では、定温室で蛍光灯を用いて連続照明を行ない、室温に置いたものは自然日長と自然光の下で実験を行った。

子房を植えた各時期の違いによる種子形成

の相違の調査は、交配後1日目から順に日を追って10日目まで行なった。

用いた基本培地はいずれも Nitsch のものである。

結 果

自然条件下における交雑結果

子房の人工培養を行なうための交配を行ない、植え込んで以外のものは自然条件下に放置して、対照として種子稔性を調査した。その結果を表71に示す(表71)。表71には3つの対照区を示してあるが、NO.1は培養基組成の違いについての対照区であり、NO.2は糖濃度と光の条件についての対照区であり、NO.3は植え込む時期による種子形成の相違をみるための対照区である。

表71のNO.1の培養基組成の違いによる種子形成の実験の対照区では、調査した菜の数は雪白体菜が6個体、野崎白菜の4倍体が4個体であった。種子稔性は26%および36.4%と倍が

Table 71. Results of crossing experiment under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
N o . 1 .					
2x x 2x	6	36.0	11	7.6	100
4x x 4x	4	48.5	32	36.4	100
N o . 2 .					
2x x 2x	5	36.6	10	9.1	80.0
4x x 4x	4	42.0	30	34.1	93.3
N o . 3 .					
2x x 2x	6	55.3	144	96.0	96.5
4x x 4x	9	35.6	25	11.1	96.0

下。特に雪白体菜の検性が悪かつた。しかし得られた種子の発芽は良好で、いずれも100%であつた。なお種子検性の計算に用いた胎座の数は調査した胎座数の平均で雪白体菜で22、錦崎白菜で24と各々決めた。

表71のNO. 2は糖濃度と光の条件を調べたときの対照区でNO. 1と同じ傾向を示したが、表71のNO. 3の植え込ま時期による種子形成の差異の対照区は、NO. 1とNO. 2の場合と異なる。

リ2倍体の雪白体菜の場合は96.0%と非常に良く、4倍体の野崎白菜では逆に種子稔性が下って11.1%であった。得られた種子の発芽はいずれの場合においても良好であった。

植え込み時における子房の長さ

培養時における子房の長さも表72と表73に示す(表72, 表73)。表72のNO.1は、培養基組成の違いについての実験のもので、表72のNO.2は糖濃度と光の条件について実験に植え込んだものである。いずれの場合も10個体

Table 72. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. length of ovary (mm)
No. 1.		
2x x 2x	10	23.3
4x x 4x	10	18.6
No. 2.		
2x x 2x	10	25.8
4x x 4x	10	17.2

の子房を測定し

たが、どちら

においても雪白

体菜の場合のオ

が長く、4倍体

の野崎白菜の場

合より5mmから

8mm長かった

Table 73. Average length of cultured ovaries (mm)

Cross	Days after pollination	No. of ovaries examined	Av. length of ovary (mm)
2x x 2x	1	9	10.7
	2	10	17.5
	3	10	17.5
	4	10	25.3
	5	10	35.3
	6	10	37.4
	7	10	42.1
	8	10	54.4
	9	10	55.6
	10	10	55.0
4x x 4x	1	10	10.7
	2	10	12.6
	3	10	13.1
	4	10	19.4
	5	10	22.8
	6	10	26.6
	7	10	29.7
	8	10	33.3
	9	10	39.4
	10	10	38.2

表73は交

配後1日目

から日と順

に追って10

日目まで

房を植えた

んだときの

長さとなし

たものであ

る。雪白体

菜のオは、

交配後1日

目から2日

目、3日目から4日目、4日目から5日目、

7日目から8日目にかけ、莢の全長が著しく

つたが、8日目以後には、莢の全長はほ

んどなく、收穫期のものと変りなかった。

4倍体の野崎白菜のオは、雪白体菜のように

著しい生長はなく順次生長と続け、8日目には

ほとんど收穫時の莢の長さとならなかつた。

11 下。

培養基組成の違いによる種子形成

表70の培地組成の実験区に植之込んだ子房の種子形成等についてこの結果のうち、表74には雪白体菜、表75には4倍体野崎白菜についてのものとする(表74、表75)。各組み合わせとも平均10個の子房を植之込んだ。收穫した莢の長さは2倍体の雪白体菜の方が、4倍体の野崎白菜よりも長く、培地組成による差異は認められなかった。得られた種子数とその発芽率についてみると、基本培地だけの培地組成においても、他の培地組成に較べてかなり良い種子形成がみられ、その種子の発芽率も良かった。添加された有機物の種類と濃度による種子形成の差異はなく、むしろ2倍体と4倍体との間において、種子形成の差異がみられた。

各培地組成について検討を行なうと、Nitschを基本培地としたものでは、基本培地だけの

Table 7#. Effects of certain media on cultured ovaries in the cross of diploid *B. campestris* cv. Seppakutaina

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
N-1	10	10	37.6	-	18	3	8.2	94.4
N-2	10	10	41.3	-	18	8	8.2	66.7
N-3	10	9	27.9	-	2	1	1.0	50.0
N-4	10	10	31.2	-	11	4	5.0	100
Total	40	39	34.5	-	49	16	5.7	83.7
W-1	10	10	34.6	+	17	3	7.7	88.2
W-2	10	10	41.3	-	29	11	13.2	100
W-3	10	10	44.3	-	22	20	10.0	86.4
W-4	10	10	37.5	-	2	20	0.9	100
Total	40	40	39.4	-	70	54	8.2	92.9
H-1	10	10	41.8	-	17	33	7.7	76.5
H-2	10	10	44.0	-	12	31	5.5	83.3
H-3	10	10	41.8	-	10	32	4.5	80.0
H-4	10	10	37.3	-	7	21	3.2	57.1
Total	40	40	41.2	-	46	117	5.2	76.1
MS-1	10	10	38.7	-	6	18	2.7	50.0
MS-2	10	10	32.2	-	4	9	1.8	100
MS-3	10	10	34.1	-	6	4	2.7	30.0
MS-4	10	10	42.9	+	16	27	7.3	88.0
Total	40	40	38.6	-	32	58	3.6	71.9

1): Refer to Table 70.

Table 75. Effects of certain media on cultured ovaries in the cross of autotetraploid B. campestris cv. Nozak1-hakusai

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
N-1	10	10	30.9	-	16	20	6.7	37.5
N-2	10	9	28.3	-	2	17	0.9	100
N-3	10	10	25.6	-	7	19	2.9	42.9
N-4	10	9	26.2	-	9	9	4.2	44.4
Total	40	38	27.9	-	34	65	3.7	44.1
W-1	10	9	27.8	-	7	25	3.2	85.7
W-2	10	9	31.1	-	8	20	3.7	75.0
W-3	10	10	31.9	-	7	33	2.9	85.7
W-4	10	10	29.5	-	5	30	2.1	80.0
Total	40	38	30.1	-	27	108	3.0	81.5
H-1	10	10	32.7	-	5	39	2.1	20.0
H-2	10	10	33.1	-	5	22	2.1	60.0
H-3	10	9	29.2	-	4	22	1.9	50.0
H-4	10	9	33.1	-	5	31	2.3	20.0
Total	40	38	32.0	-	19	114	2.1	36.8
MS-1	10	9	31.2	-	3	10	1.4	33.3
MS-2	10	10	31.3	-	13	13	5.4	69.2
MS-3	10	9	32.8	-	20	20	7.3	80.0
MS-4	10	9	35.1	-	14	25	6.5	50.0
Total	40	37	32.6	-	50	68	5.0	66.0

1): Refer to Table 70.

とき (N-1) が、2x, 4x の自殖とも種子形成は一番良く、次には2倍体の雪白体菜では white の有機物を添加したもの (N-2) で、4倍体の野崎白菜では N-4 が良かった。

White を基本培地としたときは、2倍体の雪白体菜の場合は white の有機物を添加したとき (W-2) 最高の種子稔性 (13.2%) がみられ、次は W-3 の Morel の有機物添加のときであった。基本培地だけの区 (W-1) でも 7.7% の種子稔性がみられ、white と Morel の有機物を混合させて用いた実験区 (W-4) は最も低い種子稔性であった。4倍体野崎白菜においては、W-2 が最も良く、次いで W-1 があり、W-4 は最も種子稔性は低かった。

Heller を基本培地に用いたものでは、雪白体菜の方の種子形成とその発芽率は、基本培地の場合 (H-1) が最も良く、種子の有機物を添加するにつれて低くなり H-4 が最も低くなった。これに対し4倍体の野崎白菜では、おりの実験区においても種子稔性は変りな

く2%前後と示した。

Murashige and Skoog と基本培地としたもののうち、雪白体菜の示は MS-1, MS-2, MS-3 と稔性が低く、種々の有機物を添加した MS-4 において 7.3% の種子形成がみられた。4倍体の野崎白菜では、基本培地だけの MS-1 が一番悪く、有機物の添加によって種子形成は良くなった。

対照区の種子稔性は、2倍体雪白体菜では 7.6%、4倍体野崎白菜では 36.4% とあった(表71)ので、雪白体菜では人工培養し方が、自然条件よりも良いとみられたが、4倍体の野崎白菜の示は自然条件よりも培養した子房の種子形成が著しく低くなった。

糖濃度と光の種々の条件による種子形成の差異

培地に添加した糖濃度は、今まで用いた 50g/l を対照区として、10g, 30g, 70g と 90g とそれぞれ 1 リットルあたり添加し

子房の人工培養における種子形成の程度を調査した。その結果を表76に示す(表76)。光などの条件については、300-500ルクスで $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (N)を対照区として、暗黒下(D)、2000ルクス(L)と自然日長で 13°C から 30°C の室温(R)の条件について、種子形成の程度を調査した。結果を表77に示す(表77)。

糖濃度については、各実験区において平均10個の子房を植えた。莢の長さ、カルス形成については糖の濃度は関係がなように思えた。2倍体の雪白体菜のオが4倍体の野崎白菜よりも、種子形成は全体的によく、得られた種子はそれぞれ224粒と36粒であった。種子稔性については、雪白体菜のオでは糖濃度30g/lが最も良く、29.5%であり、次いで50g/lの22.7%であった。また10g/l取いは90g/lという低い或いは高い濃度においても種子稔性はみられ、特に高濃度においては50g/lのものと著しい差異はなかった。培養された子房に

Table 76. Effect of saccharose concentrations on cultured ovaries in the crosses of diploid B. campestris cv. Seppaku-taina and autotetraploid B. campestris cv. Nozaki-hakusai

Cross	Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	1	10	10	40.4	-	27	6	12.3	92.6
	2	10	10	44.9	-	65	5	29.5	93.5
	3	10	10	44.8	-	50	9	22.7	90.2
	4	10	10	44.0	-	39	15	17.7	100
	5	10	9	40.0	-	43	29	21.7	100
Total		50	49	42.8	-	224	64	20.8	96.4
4x x 4x	1	10	9	29.8	-	2	7	0.9	50.0
	2	10	9	32.6	-	8	22	3.7	75.0
	3	10	10	34.1	-	15	43	6.3	73.3
	4	10	9	32.4	-	10	22	4.6	60.0
	5	10	10	33.0	-	2	46	0.4	50.0
Total		50	47	32.4	-	37	140	3.3	67.6

1, 2, 3, 4 and 5: Each medium contains 10g/l, 30g/l, 50g/l, 70g/l and 90g/l saccharose respectively.

Table 77. Effect of physical factors on cultured ovaries in the crosses of diploid *B. campestris* cv. Seppaku-taina and autotetraploid *B. campestris* cv. Nozaki-hakusai

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	N	10	10	45.7	-	64	14	29.1	100
	D	10	10	42.2	-	54	12	24.5	78.0
	R	10	10	49.7	-	45	15	20.5	75.6
	L	10	10	46.0	-	37	33	16.8	75.5
Total		40	40	45.9		200	74	22.7	84.0
4x x 4x	N	10	9	32.2	-	13	33	6.0	53.8
	D	10	7	30.9	-	2	19	1.2	0.0
	R	10	10	32.5	-	9	24	3.8	55.6
	L	10	10	31.8	-	4	25	1.7	50.0
Total		40	36	31.9		28	101	3.2	50.0

1),

N: 300-500 luxes continuous illumination by fluorescent lamp at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$
D: Continuous darkness at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.
R: Room temperature ranged from 13°C to 30°C and 300 luxes at maximum.
L: 2000 luxes continuous illumination by fluorescent lamp at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

(243)

おける種子形成は、対照及の自然条件のもの（9.1%）よりも、いずれも良い種子形成がみられた。得た種子の発芽率は自然条件下のものとほぼ同じであつた（表71, NO2）。野崎白菜の種子稔性は、雪白体菜の場合に較べて全般的に低かつたが、50g/2のときが最も良く、70g/2, 30g/2の順に続き、10g/2と90g/2においては僅かに0.9%と0.4%の種子稔性を示した。対照及に較べて著しく低い種子稔性であつた。得た種子の発芽率は最高5%であり、自然条件のものより幾分低かつた。

光や温度条件に関しては、菜の長さ等には切り口のカルス形成への影響はなく、2倍体と4倍体との間に差異がみられた。得た種子は2倍体が200粒、4倍体が28粒であつた。雪白体菜の種子稔性は300~500ルクスの条件のときが最も良く、次いで暗黒条件下であり、室内の自然光に次いで2000ルクスの強い光の順にあり、2000ルクスは種子形成に有効でなかつた。これら得られた種子稔

性は、対照区のものより良く、その発芽率も対照の自然条件のものと同様であった(表7、NO.2)。野崎白菜の種子形成については、全般的に低かったが、その中でも300~500ルクスの光の条件が最も良く、室内条件のときからこれに続き、2000ルクスの光条件は有効がないと思えた。自然条件下における対照実験区と較べると、種子稔性は著しく低い値を示した。

子房の植之と玄時期による種子形成の差異

交配後1日目から10日目にはたつて、順次日を追って子房を植之とみ、種子形成等について調査した結果を表8に示す(表8)。各区平均10個の子房を植之とみ、收穫期における莢の長さを見れば、雪白白菜、野崎白菜のいずれにおいても交配後9日目までのものは、培養された時から莢の生長が認められ、それ以後になると植之とんどからの莢の

Table 78. Interaction between seed formation and date of ovary culture after pollination in the crosses of diploid *B. campestris* cv. Seppaku-taina and autotetraploid *B. campestris* cv. Nozaki-hakusai

Cross	Days after pollination	No. of ovaries cul- ture	No. of ovaries exami- ned	Av. capsule length (mm)	Av. callus forma- tion	No. of seeds obtain- ed	No. of imma- ture seeds	Seed set (%)	Seed Germi- nation (%)
2x x 2x	1	10	10	25.9	-	9	11	5.0	100
	2	10	10	32.2	-	44	4	20.0	100
	3	10	10	32.5	-	25	11	11.4	92.0
	4	10	10	41.2	-	70	11	31.8	100
	5	10	10	46.8	-	58	22	26.4	96.6
	6	10	10	43.3	-	74	31	33.6	95.9
	7	10	10	49.1	-	113	17	51.4	96.5
	8	10	10	57.4	-	130	16	59.1	95.4
	9	10	10	56.4	-	131	3	59.5	93.1
	10	10	9	55.7	-	164	22	82.8	91.5
Total		100	99	44.1		818	148	37.6	95.1
4x x 4x	1	10	10	13.4	-	5	4	1.7	60.0
	2	10	10	17.5	-	3	4	1.3	100
	3	10	9	18.1	-	1	2	0.4	100
	4	10	10	23.6	-	2	19	0.8	0.0
	5	10	10	26.4	-	7	8	2.9	28.6
	6	10	9	30.7	-	7	28	3.2	57.1
	7	10	9	34.0	-	20	27	9.3	85.0
	8	10	10	35.5	-	27	39	11.3	66.7
	9	10	8	40.5	-	32	29	16.7	81.3
	10	10	9	38.3	-	30	29	13.9	73.3
Total		100	94	27.8		134	189	5.9	71.6

生長が止まりつゝしまりつゝした。これは自然条件下における生長と似ていた(表ク3)。

菜の生長の割合は、交配されたから植え込まれるまでの時期の短い方が著しかった。特に雪白白菜においては約15mmの生長がみられた。カルスの形成はほとんどいずれの実験においても認められなかった。雪白白菜の種子形成については、818粒得られたがこれは大体1次直線を増加していった。交配後7日目になると50%以上の種子稔性であった。また交配後1日目に植え込まれた子房においては9粒(5%)の種子を得た。その種子の発芽率はいずれも良く、90%以上を示した。

野崎白菜の種子形成については、全般的に悪く、種子稔性は16.4%と低かった。交配後8日目以後に植え込んだものでは、自然条件下のものを超えるものもあった。交配後1日目、2日目、3日目、或いは4日目の種子形成より良く、5日目以後にあつては順次種子稔性は上

昇した。

(ii) 2倍体 Brassica campestris L.
ssp. chinensis (L.) Makino と同質

4倍体 Brassica campestris L. ssp.
pekinensis (Lour.) Olsson の間の

交雑不適合性における遊離アミ

ノ酸の消長

ここに Brassica における $2x$ と $4x$ の交配種子
の崩壊の過程における遊離アミノ酸の消長と
それと組織学的に観察された胚発生の異常と
の時間的關係について調べた。

材料および方法

この実験に用いた材料は2倍体=食目体菜
と同質4倍体チーフ白菜で、それぞれ $2x \times 2x$ 、
 $2x \times 4x$ 、 $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交配を行なった。

遊離アミノ酸の消長を調べる研究は、交配後9日目から12日目に胚発生の異常が著しく出現する結果に基づいて(A-(1)-(i)参考)、交配後9日目、12日目と15日目の3区において調査した。その方法は交配後9日目、12日目と15日目の各莢を植物体から切り取り、莢から発達途上にある未熟種子を取り出し、直ちに95%熱エタールで固定した(西山市三編 1961)。その後各莢砂を加えて乳鉢ですって、遊離アミノ酸の抽出を行なった。

抽出に用いた各交配組合せの胚珠の生体量は500mgから1000mgで、その胚珠数は数えなかったが、交配に用いた花数は80花から150花であった。

遊離アミノ酸の抽出液は濃縮後、各交配組合せの濃度が一定量になるように調整して、その一定量の液をペーパークロマトグラフ法によって分析をした。用いた濾紙は東洋濾紙NO. 51 (40cm x 40cm) であり、その一端にドライヤーを用いて点滴した。添加した試料を乾燥

した後、濾紙を円筒形にし、大型シャーシの中に立て、外側をガラスの器でおおって、1~2時間後に展開液の蒸気でガラス器内を満たしてから展開を行なった(柴田村治1957)。15から18時間室温で展開した後、即ち溶媒が原点から約23cm上昇したとき展開を止め、風乾した。一次元の溶媒にはn-ブタノール:氷酢酸:水(4:1:2)を用い、二次元には水飽和のフェノールをアンモニアガスの中を用いた。なお特定のアミノ酸を分けるのに一次元には水飽和コリガン、二次元には水飽和ベンチルアルコールとn-ブタノールを用い、下降法を使用した(Consdor et al. 1944)。

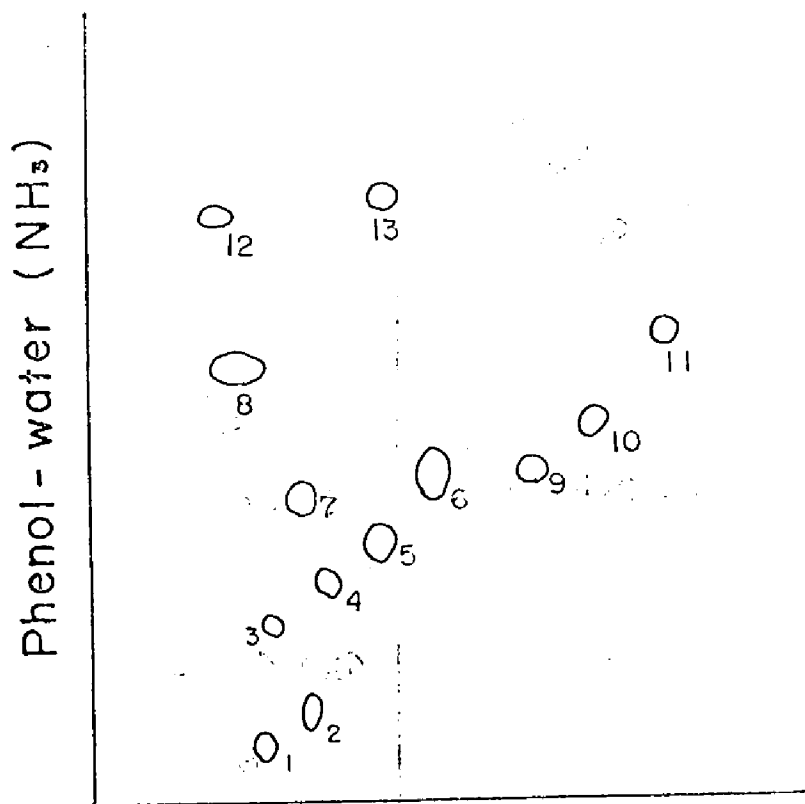
展開したクロマトグラムの着色には、水飽和のn-ブタノールに0.2%のニヒドリンを溶いたものを用いて、撒布後110°C 10分間で染色させた。定量は着色後濾紙からスポットを切り取り、細片して、50%エタノール1時間から4時間につけて室温で抽出し、プロリンの440 mμ以外は550 mμの吸光度

を測定した。いずれのアミノ酸の定量的場合もブランクと対照とした（日本化学会報 1954）。測定に用いた器機は島津の分光光度計である。

結 果

アミノ酸の標準試薬の混合液を原点につけて二次元クロマトグラフを行い、標準の R_f の値をあらかじめ調べた。実験材料で検出された総ての遊離アミノ酸とその名称を図22に示す（図22）。

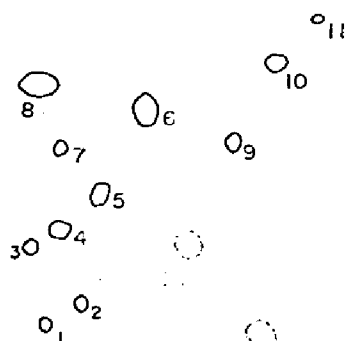
交配後9日目と12日目の各組合せにおける遊離アミノ酸の定性と $2x \times 4x$ の15日目のものの定性を模式的に図23に示す。図23-1は $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の9日目と12日目のものを示し、図23-2と23-3には、 $2x \times 4x$ の9日目、12日目と15日目および $4x \times 2x$ の9日目と12日目と示す（図23-1, 23-2, 23-3）。図23-1に示すように、 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の9日目



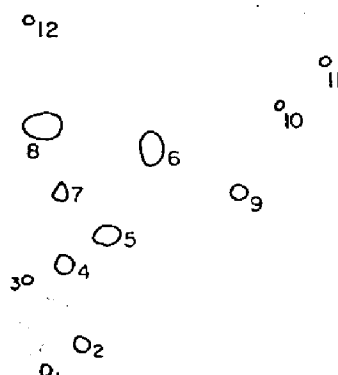
BUOH: AcOH: H₂O (4:1:2)

- 1, Asparatic acid. 2, Glutamic acid.
 3, Serine. 4, Glycine. 5, Threonine.
 6, Alanine. 7, Asparagine. 8, Histidine.
 9, Tyrosine. 10, Valine and Methionine.
 11, Leucine. 12, Arginine. 13, Proline.

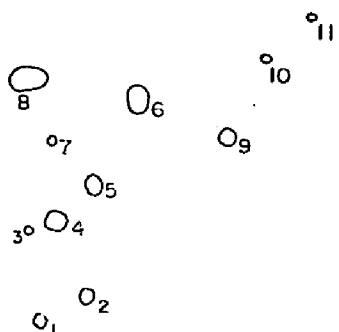
Fig. 22. Schematic chromatogram detecting free amino acids in immature ovule of Brassica.

$2x \times 2x$ 

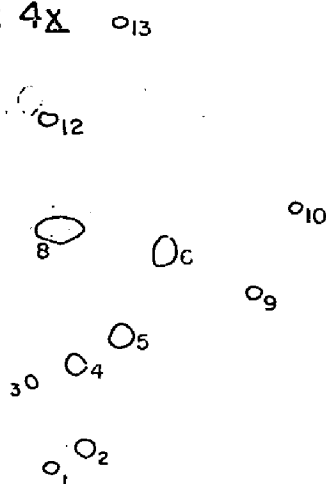
9 Days after pollination

 $4x \times 4x$ 

9 Days after pollination

 $2x \times 2x$ 

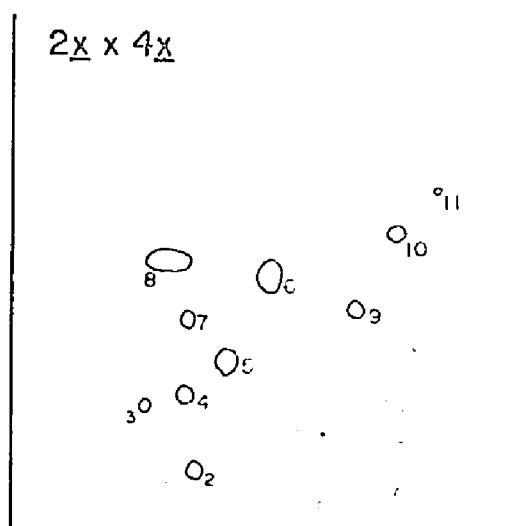
12 Days after pollination

 $4x \times 4x$ 

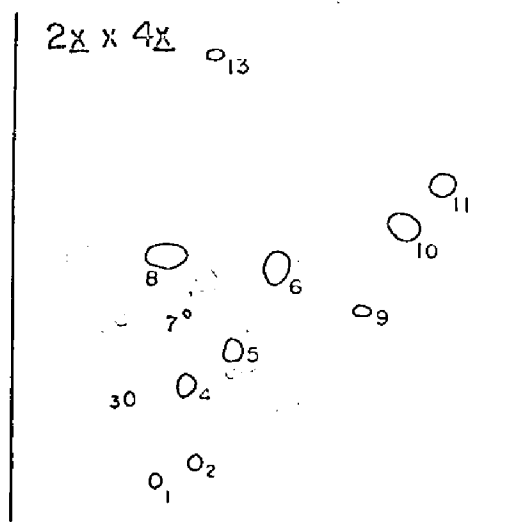
12 Days after pollination

Fig. 23-1. Schematic chromatogram of free amino acids at 9 and 12 days after pollination in the crosses of $2x \times 2x$ and $4x \times 4x$.

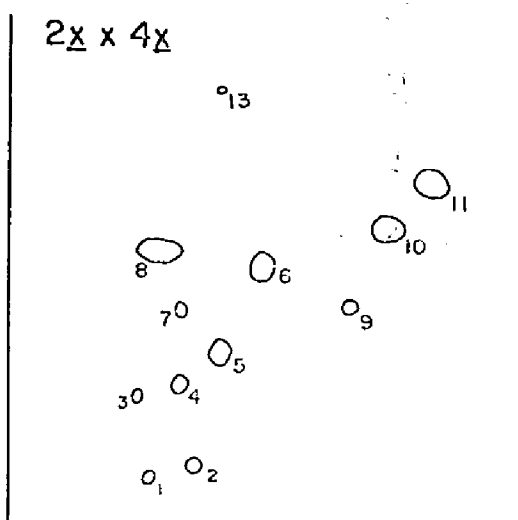
254.



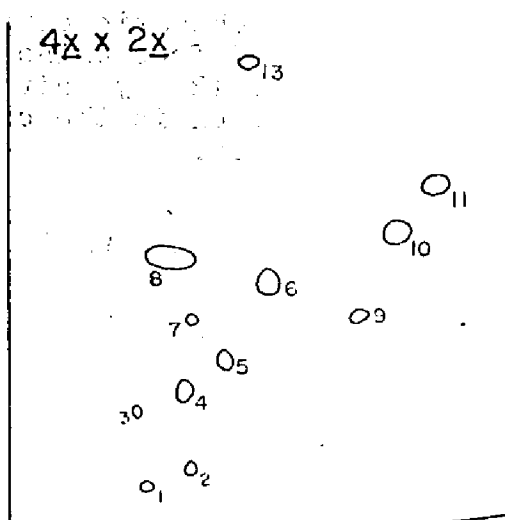
9 Days after pollination



15 Days after pollination

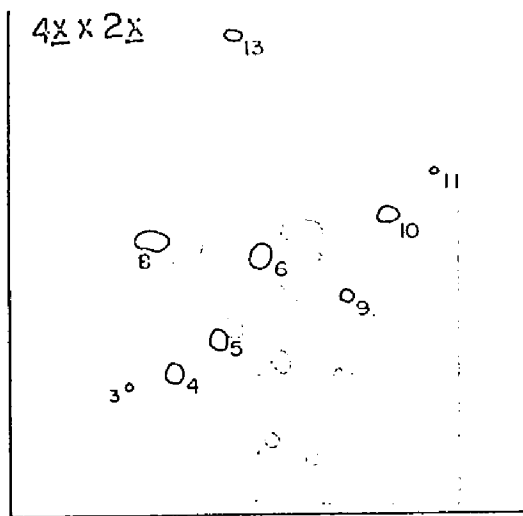


12 Days after pollination



9 Days after pollination

Fig. 23-2. Schematic chromatogram of free amino acids at 9, 12 and 15 days after pollination in the crosses of 2x x 4x and 4x x 2x.



12 Days after pollination

Fig. 23-3. Schematic chromatogram of free amino acids at 12 days after pollination in the cross of $4x \times 2x$.

と12日目には、
著しい差異はみ
られなかったが、 $2x$
 $\times 2x$ には、 $2x$ は試
料として添加した
量では、アルギニ
ン(12)の点が発
見されなかった。

$4x \times 4x$ では交配後
12日目になると
ロリニン(13)の点

が発見された。いずれのアミノ酸においても
交配後9日目と12日目には、量的な著し
い差異のみられるものはなかった。 $2x \times 4x$ と
 $4x \times 2x$ には、いずれにおいても交配後
9日目と12日目、或いは $2x \times 4x$ の15日目と日
を追うことによつて、アミノ酸の量的な差異
が現われた。 $2x \times 4x$ では、交配後12日目と15
日目には、ロリニン(13)が発見された。また
4オニンとバアリン(10)とロイシン(11)

に關しては、9日目から12日目になると著しい増加がみられ、これは15日目になつても継続してゐた。その他のアミノ酸についてこの量的な変化は余りみられなかつた。 $4x \times 2x$ においては、9日目と12日目のいずれにおいてもプロリン(13)が出現した。またメチオニンとバアリン(10)とロイシン(11)については、9日目において多量検出され、 $2x \times 4x$ の12日目あるいは15日目のものと同じ程度であつたが、12日目になると減少してしまつた。ここでは他のアミノ酸についても量的に減少し、検出されなかつたものもみられた。

定性的に調べた遊離アミノ酸検出に用いた展開液では、交配後の日数によつて量的に変化したメチオニンとバアリン(10)とロイシン(11)の点のうち、メチオニンはバアリンと、ロイシンはイソロイシンとほぼ同じR_Fの値を持つてゐることから、それぞれのアミノ酸の分離と行なうために他の展開方法と展開液を用いて、メチオニン、バアリンとロイシン

とイソロイシンの同定を行なつた結果、 $\times 4$ オニの点にはバアリンを含み、ロイシンの点にはイソロイシンを含まないことが分つた。即ち(10)の点は $\times 4$ オニとバアリンの混合物として出現し、(11)の点はロイシン単独の点であつた。

定性についでこの研究では、 $2x \times 2x$ 、 $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ では交配後9日目と12日目を調べ、 $2x \times 4x$ では15日目までを調べたが、定量にあつたのは $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の15日目の定量も行なつた。なお $4x \times 2x$ の15日目の胚珠は枯死してゐて、褐変してゐたので調査が出来なかつた。

その結果、量的な変化のはつきりみられる $\times 4$ オニとバアリン(10)とロイシンについてこの結果を表24に示した(表24)。破線と記号の記入してゐるものは定性のときにこんな程度度の点として認められたが、定量的には測定出来なかつたものを示してゐる。 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ にはおいては、交配後9日目から15日目になるに従つて $\times 4$ オニとバアリンの量的変化はほと

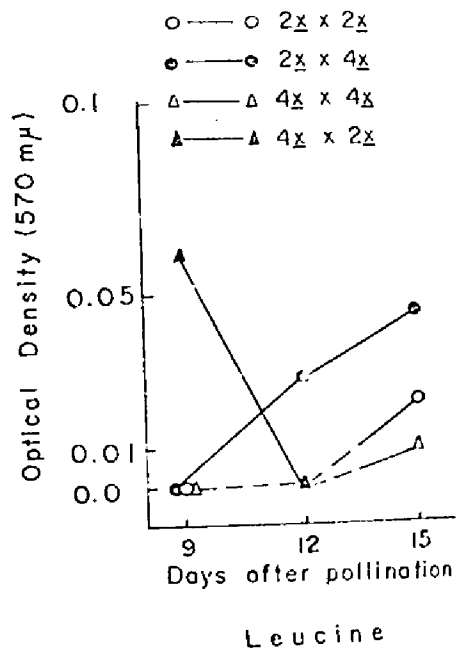
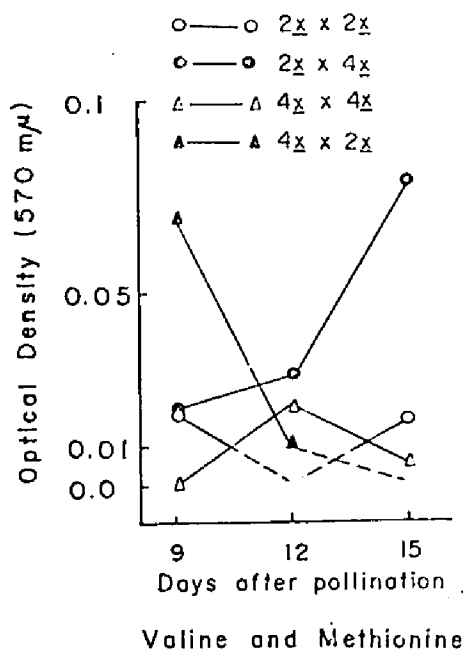


Fig. 24. Quantitative analysis of chromatogram of valine and methionine, and leucine at certain days after pollination.

しど認められなかったが、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ には、
 これは、対照的にも差がなかった。即ち $2x \times 4x$ 2" は9日目から15日目にかけてこれらのアミノ酸は順次増加するが、 $4x \times 2x$ 2" は9日目には最も高濃度で存在し、 $2x \times 4x$ の15日目に相当して11日。そしてその後急速に消失した。ロイシンについては、同じような傾向をもつて11日、

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ では余り量的変化がなかったのに対し、 $2x \times 4x$ では9日目にはほとんど認められなかったのに、12日目、15日目と日が進むにつれて、著しく量の増大がみられた。

$4x \times 2x$ では9日目には少量存在したのが、日を追うに従って著しく減少を示した。

(4) 考察および論議

(i) 胚発生学的研究

胚発生学的研究は大きく2つに分けられる。1つは自然条件下における観察であり、1つは人工的に培養したときの種子形成とその発達過程の観察である。

自然条件下における胚発生

Brassica campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Olsson の同質4倍体 ($4x=40$) と2倍体 B. campestris L. ssp. chinensis (L.) Makino ($2x=20$) の正逆交雑が成功しないのは、受精した胚珠が発生の初期に死滅することによって起こる。この致命的な

胚珠中の組織学的変化は、正逆交雑において、異なっている。 $2x(\sigma) \times 4x(\sigma)$ における種子崩壊の最初の徴候は、交配後9日目には、胚乳の細胞に多数の空胞が出現することである。この空胞化は、続いて雑種の胚乳の生理学的な異常を引き起こすようになる。続いて12日目には胚乳の空胞化が著しくなると共に核の崩壊が始まった。著しい核の崩壊をまぬかれ胚細胞では、15日目から18、21日目の間に巨大核の形成或は染色質顆粒の凝集などが見られ、胚乳の膜形成はついに起こらなかった。また胚の発達も通常球型或は、まれには "flat top" 型の段階で止まってしまった。

$4x(\sigma) \times 2x(\sigma)$ の交雑では、雑種の胚乳は正常なゲノム構成の胚乳よりも1ゲノム少ない構成になつてゐる。交配後6日目には胚乳の膜形成が始まるが、胚乳自体の量が少く、しかし胚乳の退化は交配後12日目になつて始まる。その時期には、胚珠の中には胚乳が見当たらないで、しかも胚だけが残存してゐるものが

多数脱落した。次の時期には胚珠は空になり、内皮も退化を始めるのがみられる。

正交交雑の胚の生育はその両親の胚の発達と初期においてはおなじであるが、交配後9日から12日目になると生育は止まってしまう。これは胚自体に原因があるのではなく、胚乳の異常な発達によって引き起こされるものであろう。

Lilium と Hyacinthus との胚の発生において、胚乳核の染色体切斷が雑種では頻繁に、自家稔性の種の交配にあつても時々出現して、胚乳の退化と胚の消失とをもたらしうることが報告されている (Brock 1954a, b, 1955)。 Avena strigosa ($2n=14$) x A. fatua ($2n=42$) の交雑では、胚乳核の体細胞分裂の異常は染色質の大きな固まりの形成による胚珠の退化が Kihara and Nishiyama (1932) によつて報告された。また Triticum の正交交雑 (Wakakuwa 1934, ^{Boyes and} Thompson 1937) と Aegilops の正交交雑においても同じような胚乳の異常が報告されている (Katayama 1933)。 Hordeum jubatum

($2n=28$) x Secale cereale ($2n=14$) の交雑の胚乳で、鉄壺鈴形 (dumb-bell-shape) の核きには高倍数性の核の出現を Cooper and Brink (1944) は報告している。ここで行なつた Brassica の観察では、上述のような種類の胚乳核の異常は、いずれの正逆交雑においても、退化の最初の段階では見られなかった。

興味あることには、 $2x \times 4x$ では 3 倍体の雑種が得られなかったが、 $4x \times 2x$ では少数の 3 倍体雑種が得られた。 $4x \times 2x$ では胚乳の発達は貧弱であるが、その発達には致命的と思われる異常がある。この初期の胚乳の退化から見て胚珠から倍体雑種を形成するものと考えられる。まず Avena の $6x \times 2x$ の交雑 (Kihara and Nishiyama 1932) や Raphanus の $4x \times 2x$ の交雑 (Inomata 1970) では、同いような胚乳の発達過程が観察されている。そして低い稔性で F_1 の雑種種子が得られた。ここで行なつた $4x \times 2x$ の交雑では、稀に F_1 雑種の種子が得られたが、 $4x \times 4x$ で得られるものと同じ大きさのものであった。

(表 6, 7)。

Brink and Cooper によつて報告された胚嚢に接して母体組織の異常増殖の為に種子の胚発生の途中で崩壊が起つて、不稔種子になる

"somatoplastic sterility" と呼ばれる現象は、

Lycopersicon pimpinellifolium (Cooper and Brink 1945)

の 2 倍体と 4 倍体との正逆交雑や、Medicago

(Brink and Cooper 1939), Primula (Woodel 1960a, b) の種

間雑種において観察されている。また Datura

(Satina et al. 1950, Sansome et al. 1942) の或る交雑

では胚珠内に腫瘍が出来る、これが胚嚢一

杯に広がりその結果不稔種子になることが報

告されている。ここで行なつた Brassica の交雑

では、胚嚢に接して母体組織の内皮の異常増

殖は正逆交雑とその両親の交配のいずれにも

認められなかった。

Avena strigosa ($2n=14$) と A. fatua ($2n=42$) の交雑で、

卵細胞はそのいずれの両親の自殖よりも急速

に分裂することが Kihara and Nishiyama (1932) によ

つて報告されている。そして胚乳もまた初期

から急激に増大してくる。それが次の段階において異常な核分裂や胚乳の崩壊を引き起こし、胚珠は空になつてしまう。更に *A. fatua* x *A. strigosa* の交雑では、胚の細胞分裂は遅れ、胚乳の生育もまた非常に貧弱であるが、膜形成は他の交雑組合せよりも早く起る。その結果出来る種子は通常その両親の自殖したもののよりも小さくなる。Kihara and Nishiyama の考へに従えば、雄の配偶子が雌のそれよりも高い倍数性を持つてゐるときには過剰の刺激力 (stimulative strength) が受精した卵や極核の体細胞分裂を始動させる。その結果胚乳や胚の核分裂が異常な速度で起るようになる。一方雄の配偶子が雌のそれよりも低い倍数性を持つ場合は、雄の核の "stimulative strength" が小さいので、胚や胚乳の生育が抑えられてしまう。*Brassica* の正逆交雑においては、*Avena* においてみられたと同じ現象が、はつきりと交配後6日目の胚乳の核分裂とその发育速度から分かつて (図3)。しかしながら胚の濃度にあつ

とはどのような傾向がほとんど認められなかった。9日目の胚乳の発育の差異は、共に胚乳の異常な発達によって影響を受けた二次的なものと考えられた。

緒言に挙げた文献以外にも種間雑種或は染色体の異なる倍數性間の雑種の若し胚珠の崩壊の報告は多数みられる。この不稔現象は、被子植物が重複受精を行なうことと密接な関係がある。そして更に正逆交雑において発芽種子の出来る交雑は種によって異なっており、これを記すと下記の如くなる。

$2x(\text{♀}) \times 4x(\text{♂})$	$4x(\text{♀}) \times 2x(\text{♂})$	例
+	+	<u>Spinacea</u> , <u>Beta</u> ,
+	-	<u>Oenothera</u> ,
-	+	<u>Avena</u> , <u>Raphanus</u> ,
-	-	<u>Brassica</u> (with aa genomes), <u>Oryza</u> , <u>Capsium</u> ,

+ 成功, - 不成功

これらの事象から、交雑種子の発達或は組織学的な差異は両親の染色体関係の不均衡や異なったゲノム構成による対応の差によって起るようである。これらのことを考

慮すると、交雑種子の崩壊には1つ又は2個のゲノムが重要な役割をしていると思われる。極核の受精においては2個の雌性のゲノムと1個の雄性のゲノムが融合し、この割合が胚乳の均衡のとれた機能によって必要なものと考えられる。もしもこの2:1の割合が変わると胚乳の健全な機能は失われ、胚乳の異常な発達が起こってくるのである。

人工培養による胚発生

人工培養では、胚珠の培養と子房の培養を行なった。胚珠の人工培養ではどの培地組成からでも生育可能な種子は得られなかった。IAA, カイネチン, ジベレリン, トコトジューン, イースト抽出物等の効果については明らかにはできなかった。生育可能な種子が全く得られなかったのは、Brassica の胚珠培養において培養基組成の問題と技術的な問題とが、全く未解決であることを意味する。

培養基に関しては、Gynandropis gynandra L. と Impatiens balsamina L. の胚珠培養で発芽種子が得

られてゐるし (Chopra and Sabharwal 1963), また Anthum graveolens L. (Johri and Sehgal 1963) と Brassica (Inomata 1963) の子房の培養から発芽種子が得られてゐる。明らかに培養胚珠の栄養要求性は高等植物の種によつて異なつてゐる。B. oleracea においては、胚珠の培養の時に1%の塩化カルシウムで胚珠を処理してから人工培養に拂して、75粒中2粒の発芽種子を得てゐる (Kameya et al. 1966)。そこで用いた食用体菜と4-7白菜にこのような処理を施せば生育可能な種子が得られるかもしれない。胚珠の培養技術についていへば、胚珠が胚柄から取られて培養基の上に置かれるので、好ましくないと生理的要因が働くかもしれない (中島、松本 1969)。自然条件下では、胚珠は子房の中で胚柄を通して栄養を供給されてゐるが、人工培養下では、栄養分は必ずしも胚柄から供給されるとは限らず、或るものは胚珠の表面から供給されることになる。このようなことが人工培養の不成功の原因の1つになつてゐ

ることも考えられる。

Capsells-Bursa-pastoris の in vitro における胚培養において、自然条件に較べて栄養が遅くなり、変異が多く、分化が遅れてくる。そして培養した胚では形態的な異常もみられる (Monnier 1963)。ここで行なった研究においても異常な胚や分化の遅れた胚、或は異常な胚柄が観察された。しかしながらこれらの異常は生長調整物質によってもたらされたものなのか、培地に加えた他の栄養物によってもたらされたものなのか、或はまた栄養初期の人工培養によるものかは決定出来なかった。

子宮の人工培養を行なったものの胚発生では、胚珠の人工培養のように全く発達しないものだけでなく、種々の段階のものを観察した。

Datura stramonium の球型胚は "heart" 型の幼胚を胚珠から無菌的に取り出して、人工培地上で生育させるとき、高圧滅菌をしなかつたナットミルクを培地に添加すると幼胚の着し

に生育がみられ、新しい個体とつくることか
出来る。また高圧滅菌したココナツトミルク
と添加した培地でも、或いはビタミン類だけ
を添加しても、胚の発達程度に種々の段階が
みられ、同程度発達したもののでも形態的な差
異がみられる (Van Overbeek et al. 1941)。また

Brassica oleracea (♀) × B. campestris (♂) の交配では
通常雑種が得られない。この場合、幼胚の形
成は始まるが、やがて退化してしまふ。胚の
発達状態を調べてみると、交配後30日目にな
つても、発育の途中にあり、奇型を呈している
(Nishi et al. 1959)。ここで行なつた Brassica の人
工培養した子房の観察でも胚柄の異常 (図6c
)、分化に入るべき球型胚での細胞分裂の継
続 (図6d)、子葉部位の異常発達 (図6u)、
奇型胚の形成 (図6e, p) 等の異常が観察され
たが、これらの異常は観察した胚の数に較べ
れば少なかった。最もふつうに観察されたの
は、奇型や異常ではなくて、球型或いは "heart"
型胚での発達の停止であつた。

胚乳の発達に関していえば、胚珠中には全く存在しないもの、崩壊が起って僅かに残存するもの、種々の異常を呈するもの等がみられた。胚乳の膜形成についてみれば、"heart"型或は"torpedo"型の胚をもつ胚珠であるにも拘らず、胚乳が全体的に右下膜形成を起していったもの、その逆に胚は未発達で球型であるにも拘らず、胚乳の膜形成は既に全面にみられるもの(図6k), 或いは胚が相当なもののに胚乳の膜形成だけが、全面的に観察されるものなどが観察された。自然条件下における胚珠では、胚乳の膜形成は胚が球型から"heart"型に分化するときに、胚の周辺部から始まるが、人工培養のものでは、胚と胚乳の発達がちがはぐのものがみられた。人工培養でみられる胚乳の種々の異常は、自然条件下の $2x \times 4x$ で出現するものに似ていた。即ち胚乳の巨胞化と著しい巨大核の出現(図6h, i, s, v, x), 核の崩壊とその偏在(図6l, m, o, s, v)等がある。 $2x \times 4x$ の胚乳に出現した=

4x 等の異常は $4x \times 2x$ では観察されず、自然条件下でみられるように発達不良に伴う消失が観察されるに過ぎない (図 6g)。 $4x \times 2x$ において交雑種子の得難いのは、胚乳の異常によるのではなく、胚乳の発達不良に伴って胚の発達が停止するためと考えられる。 $2x \times 2x$ では胚乳の異常は観察されなかったが、 $4x \times 4x$ では、交配後 12 日目の $2x \times 4x$ に観察されたような異常 (図 6h, l) や、子房の人工培養でみられたような異常 (図 6o, v), 又は "basal endosperm" の崩壊 (図 6l), などが観察された。これらのことから $2x \times 4x$ の場合と同じように、胚乳の崩壊が $4x \times 4x$ の不稔現象に関係していることが分かった。このような胚乳の異常に伴う不稔種子形成は Brassica の他に Lilium と Hyacinthus においても報告されている (Brock 1954a, b, 1955)。またエニハク (Kihara and Nishiyama 1932), オオムギ (Cooper and Brink 1944), および小麦 (Wakakuwa 1934) の雑種においても、胚乳核分裂の異常が詳細に記述されている。

ココナットミルクの添加培地から2粒の交雑種子($2x \times 4x$)が得られ、いずれも生育して、雑種固有の葉色体構成と形態的特徴をもつ植物がえられた(Inomata 1968)。しかし、ここで行なった組織学的な観察においては、胚乳に膜形成はまったくみられず、胚乳はいずれも粒々の異常を呈していた。このことから子房の人工培養によつて、 $2x \times 4x$ の交雑種子を容易に得ることは現在の技術をもつてしては依然として困難である。

Papaver の胚珠の人工培養では、培地には IAA とカイネチンとを添加すると、胚の発達が良くなり、自然条件よりも良い発育がみられてゐる(Maheshwari 1958)。また Anthurum の子房の人工培養でも IAA とジベレリンの添加で成熟種子が得られた(Johri and Sehgal 1963)。 Gynandropis の胚珠培養では基本培地には IAA を添加するとよい生育がみられた(Chopra and Sabharwal 1963)。

Capsella の幼胚を胚培養すると、自然条件下のものよりも生育が遅くなり、胚珠中で生育し

胚に較べて変異が大きく、令化能が低下する
 ことが知られてゐる (Monnier 1968)。本実験で
 組織学的並かに発生学的に Brassica の人工培養
 子房を観察した結果、IAA, ジベレリン, カイ
 ネチン等の作用物質を単独、或いは複合的に
 加えても、無添加のものと差異がないこと、ま
 してすべての胚生育は自然条件下のものより
 も3日から1週間早いことが観察された(図
 7)。また基本培地にイースト抽出物, ココ
 ナットミルク, カゼイン酸分解物を添加する
 と、胚発達の良好な胚珠が基本培地の場合よ
 りも数多くみられたが、成熟種子になると思
 われる胚の発達程度は変わりなく、自然条件
 下のものよりも3日から1週間早い発達程度
 を示した(図7)。またこの成熟種子になる
 と思われる胚の良好な発達は、交配の組合せ
 に関係がなかった。このように Brassica の子房
 の人工培養においては、成熟種子まで発達出
 来ると思われる胚の発育程度に対しては、成
 長調整物質, イースト抽出物, カゼイン酸分

解物, ココナツトミルク等の効果は認められ
なかつた。しかしながら, イースト抽出物,
カゼイン酸分解物, ココナツトミルク等の添
加によつて, 発達良好な種子形成の割合は明
らかに増大した。

(ii). 器官の人工培養による雑 種植物の育成

人工培養による雑種植物の育成に関しては
4つに分けて実験を行なつた。胚培養, 胚珠
培養, 子房の培養と子房培養による合成ナブ
ス型植物の育成である。

胚培養

Brassica の $2x \times 4x$ 或いは $4x \times 2x$ の組織学的な
研究において, 不稔種子の形成は胚に直接的
原因があるのではなく, 胚乳の発達異常によ
り胚の崩壊が起るためであることが分かつ
た。これに基づいて雑種胚の人工培養を行な
つた。修正 white の基本培地に Lupinus の未熟種

子から得た "embryo factor" を添加することによつて雑種個体を得ることに成功した。こゝで用いた "embryo factor" は Datura や Pharbitis などの胚発生に著しい効果を示したものである (Katsubara 1962, 1964), かつ本実験の Brassica の $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ 胚の発育にも効果があつた。

Datura の胚培養では, "heart" 型胚 (0.15-0.2 mm) の培養が Van Overbeek らによつて可能となつた (Van Overbeek et al. 1942), また 100μ 以下の球型胚では, 胚培養は非常に困難であるとかから "heart" 型段階が人工培養の限界であるといわれている (Wardlaw 1955)。最近 Brassica の種間交雑した不稔個体から, 胚を摘出し培養が試みられた (Nishi et al. 1959)。そのときの胚は "late torpedo" 型期のものではあつた。"late heart" 型期以前の胚の人工培養はまだ試みられていない。本実験で試みた Brassica の $2x$ と $4x$ 間の正逆交雑では, 組織学的観察から明らかに, $2x \times 4x$ および $4x \times 2x$ とともに稀に "heart" 型に達するものがあるが, ほとんどの

胚は球型の状態まですしか発露せず、退化してしまう。このことからより早い時期に胚珠から胚を摘出して人工培養することが必要となつてゐた。Lupinus の未熟種子から抽出した "embryo factor" はこの点有効であることが分かつてゐた。またこの "embryo factor" は 1.0 kg/cm^2 の圧力で10分間滅菌してもその効果が減少しないので、簡便に使用出来る利点を兼ねてゐる (Matsubara 1964)。

胚珠の培養

IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジュースとイースト抽出物の添加によつても、生育出来る種子はまったく得られなかつた。また複雑した胚珠の培養に対するこれらの添加物の効果の有無も、明らかになることが出来なかつた。 $2\text{x} \times 2\text{x}$ 或いは $4\text{x} \times 4\text{x}$ の胚珠の培養においても、発芽する種子が得られなかつたことは、用ゐた培養基に欠陥があるか、Brassica の胚珠の培養が技術的に困難であるためかの何れかによると思われる。

そのうち、培養基の組成に関しては、既に胚珠培養を試み、生育する種子を Papaver (Maheshwari 1953), Gynandrocis gynandra L., Impatiens balsamina L. (Chopra and Sabharwal 1963) から得てゐるし、Anthum graveolens L. (Johri and Sehgal 1963) と Brassica (Inomata 1968) 2" は子房の培養によつて、発芽可能な種子とつくることに成功してゐる。胚珠の栄養要求が種によつて異なつてゐるかもしれないが、ここでも用いた培地には必ずしも欠陥があったとは思われない。

胚珠培養の技術的な面についてみると、胚珠を培地に植之込むとき、胚珠を胚珠柄から切り取り、培地上に置床した。このことが物理的、或いは生理的に悪影響を与えたことも考えられる。また自然条件下において、胚珠は胚珠柄から栄養分を取つて生長してゆくが、培地に置床した胚珠は必ずしも胚珠柄から養分を吸収するとは限らず、種々から吸収することも有り得る。これらのことが、胚珠の初期の発達に悪影響をもたらしたもののとも

考えられる。発達初期の胚珠の人工培養にあつては、完全な胚珠柄を除いたものと、部分的に付けたものでは、生育可能な種子の形成率が異なつてくる(嶋・松本 1969, Nakajima et al. 1969, 中島 1970)。このことから Brassica の胚珠の培養において生育可能な種子の形成がみられなかったのは、胚珠培養の技術的な問題が原因であると思われる。

子房の培養

種属間雑種や倍数性の異なるものの交配における交雑不適合性の研究については、組織学的或いは発生学的研究は数多く為されてゐるが、これ等の生理学的或いは生化学的研究はほとんどなされてきていない。Aegilops squarrosa x Triticum dicoccum の交雑においては正常な種子が発達しない。これは受精後の胚発生の初期の段階で、胚乳の著しい異常が起るためである。この胚乳の異常に伴う生長素の活性を測定した結果、交配後3日目から7日目まではつねに Aegilops x Triticum の交雑の

方が、その対照区ではある Aegilops x Aegilops よりも生長素の活性が高かった (Nishikawa 1959)。
 植物ホルモンの研究では Das et al. (1956) がタバコの髓の組織培養で、IAA とカイネチンの両者が培地に存在するときだけ真の細胞分裂が起こることを観察した。またタバコカルスの人工培養から新たに器官形成を誘起させる際、IAA とカイネチンの量的な差異によって、芽と根の再分化を制御出来ることが分かった (Skoog and Miller 1957)。ジベレリンの研究のうち細胞分裂の誘起については Hyoscyamus, Samolus (Sachs et al. 1959), Hyoscyamus (Sachs and Lang 1957), Citrus (Schroeder and Spector 1957), Phaseolus (Greulach and Haesloop 1958) 等においては、細胞分裂や細胞伸長が認められたという報告がある。また大麦の胚乳にジベレリンを添加するとα-アミラーゼの活性が高まる研究もある (Varner and Chaud 1964)。Allium cepa の leptotene-zygotene 期の葯の培養にカイネチンとジベレリンを基本培地に添加すると、花粉母分子まで発達す

る (Vasil 1957)。このように種々の組織に対し
てカイネチン, ジベレリン, オーキシンの作
用がいろいろ調べられてきている。また,
Papaver の胚珠の発達初期のものの培養には,
IAA とカイネチンの添加が良好結果を与えてい
る (Maheshwari 1958)。また Anethum の子房の人工培
養では IAA とジベレリンを添加した培地から
成熟胚が得られた (Johri and Sehgal 1963)。このよ
うに, 胚珠や子房の人工培養に IAA, カイネ
チン, ジベレリンが有効であるという報告が
多い。

これらの研究に基づいて, 本実験においては
生長調整物質として, IAA, カイネチン, ジ
ベレリンを選んで Brassica の交雑不重合種子の子
房の人工培養に対する効果を検討した。カル
スの形成に関しては, カイネチンが IAA の存
在下で大きな効果を示した。種子形成に関し
ては, 全体的に $4x \times 4x$ の方が $2x \times 2x$ よりも良
かった。特に IAA とジベレリンを添加した区
においては, $4x \times 4x$ の方が $2x \times 2x$ よりもはる

かに良い結果を示した。しかしながら全体的にみると、IAA, カイネチン, ジベレリン等の生長調整物質の直接的な効果はみられなかった。交雑種子の形成もみられたが、これも生長調整物質の濃度と平行的な関係を示さなかったもので、直接的に生長調整物質が作用していると考えられることは必ずかしい。

Nitsch (1954) に依ると、カルスの生育に対しトコトジューズはココナットミルクと同じようによい効果を示す。またトコトジューズは見熟あるいは未熟果実のいずれからつくられたものであっても、カルスの生育や胚珠の発達に効果を示す (Ranga Swamy 1959, Nitsch 1963)。イースト抽出物は Zea mays の胚乳カルス (Straus and La Rue 1954, Tabata and Motoyoshi 1965) や Pisum sativum の根起原のカルス (Torrey and Shigemura 1957) の培養に必要である。また Ginkgo biloba の花粉培養に用いられて成功をみている (Tulecke 1957)。カゼイン酸分解物は胚培養 (Zieber et al. 1950) や Haplopappus gracilis のカルスの培養 (Blakely and

Steward 1961) に有効である。ココナットミルクは、発生初期の胚の培養に特に有効であり (Van Overbeek et al. 1941), カルスの生育にも非常に効果がある (Caplin and Steward 1948, Shantz and Steward 1959, etc.)。また Ginkgo biloba の花粉培養では、カルスの形成もみられたが正常な花粉の発達も観察された (Tulecke 1957)。さらに Anethum graveolens の胚珠の人工培養において、ココナットミルクが胚珠の正常な発達に効果があった (Johri and Sehgal 1963)。基本培地にココナットミルクとカゼイン酸分解物を添加することによって、ココナットミルクだけの場合よりも良好なカルスの生育が示された (Shantz and Steward 1959)。

これ等の研究をもとにして、トマトジュース、イースト抽出物、カゼイン酸分解物、ココナットミルクと種々の生長調整物質とともに基本培地に添加し、交雑不適合性の Brassica 子房の人工培養を試みた。その結果、培養基組成による相乗がみられた。カルスの形成に

フルは、基本培地よりも、トマトジュース、
 イースト抽出物の添加したものがよく、さ
 らにココナットミルク単独、あるいはココナ
 ットミルクとカゼイン酸分解物を併用したも
 のが勝れた。種子形成にフルは、トマ
 トジュースは有害であった。しかし対照（生
 長調整物質のみ）に比較し種子形成率は、
 イースト抽出物、ココナットミルクの添加に
 よって2倍半に、カゼイン酸分解物あるいは
 それとココナットミルクの併用によって3倍
 半ないし4倍半に向上した。これらの種子の
 発芽率は対照に比較し変わらなかった。た
 だし、イースト抽出物添加の区のものはいく
 つか少かった。2x x 2x と 4x x 4x の種子形成にフル
 とみると、イースト抽出物とココナットミ
 ルクを添加したものは同じような傾向がみ
 られ、2x x 2x の方が4x x 4x よりも良かった。カ
 ゼイン酸分解物単独、あるいはカゼイン酸
 分解物とココナットミルクを併用したもの
 では逆に4x x 4x の方が2x x 2x よりも良
 くなった。

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の種子形成率が培地組成で異なるのは興味深い。3倍体の交雑種子が得られたのは、 $2x \times 4x$ ではココナットミルク添加区、 $4x \times 2x$ ではイースト抽出物添加区とカゼイン酸分解物添加区であった。同一培地から $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交雑種子は得られなかった。これは交配種子の発芽において、正逆交雑で栄養要求性に違いがあることを示唆するものと思われる。

莢の大きさについては、生長調整物質を添加したものでも、また種々の栄養を添加したものでも差異はなく、2倍体を母ネに用いた交配 ($2x \times 2x$, $2x \times 4x$) は4倍体を母ネに用いた交配 ($4x \times 4x$, $4x \times 2x$) よりも、莢の長さはいずれの場合においても短くなる傾向がみられた。

Brassica の子房の人工培養では、生長調整物質として用いた、IAA, カイネチン, ジベレリン等を培地に添加したものよりも、栄養物として用いたイースト抽出物, カゼイン酸分解

物、ココナツトミルク等を添加したものの外が、種子形成には良い結果を与えた。これらの結果によつて、イースト抽出物、カゼイン酸分解物、ココナツトミルクの3種類を各々種々の濃度で2つずつ組み合わせる培地をつくり、種子形成に対する効果を調査した。前回に較べて全般的に種子形成は低かつたが、種子形成に対する栄養物添加の量による傾向はみられた。イースト抽出物を5g/l 或いは10g/l と高濃度に添加すると、Brassicaの種子形成には好ましくなかつた。イースト抽出物とカゼイン酸分解物との組み合わせ、或いはイースト抽出物とココナツトミルクの組み合わせにおいては、用いた濃度の範囲内での種子形成はいずれも低く、特に後者の場合に低かつた。これと反して、カゼイン酸分解物とココナツトミルクを組み合わせた種々の培地では、種子形成はかなり良かつた。2x x 2x においてはココナツトミルクの20%添加においては、4x x 4x ではカゼイン酸分解物単独

足のものか、乳はココナツトミルク 10% 添加足において、種子形成は最も良かった。2x x 4x あるいは 4x x 2x における種子形成については、2x x 4x z¹ 1 粒 (CMC-3) と 4x x 2x z⁹ 1 粒とあり、そのうち発芽したものは 2x x 4x z¹ 1 粒、4x x 2x z⁴ 4 粒 (CMC-3, -6, -9, -14) z¹ あった。

4x x 2x の交雑において、収穫時の調査のときに、種子全体の発育は止んでゐるが、胎座に付着した胚のみが大きく成長してゐるものが見られた。その中には成熟胚のように発達してゐるものから "torpedo" 型までみられた。他の交配組み合わせからは、このような胚は出現しなかった。これは人工培養の途中で種皮胚乳の発達と胚のそれとのバランスが崩れ、胚だけ生育し続けて残ったものと思われた。

Brassica の子房の人工培養による種子形成については、ココナツトミルクとカゼイン酸分解物が効果があることが分ったが、これを更にくわしく調べるために種々の培養条件と交

配組合合せを用いて調査した。使用した培養基はカゼイン酸分解物について4濃度(0, 300, 500 および 1000 mg/l)と, ココナットミルクについて4濃度(0, 10, 15 および 20%)を組み合わせる12種類で, それぞれに子房を植え込んだ。その結果からみると, $2x \times 2x$ ではカゼイン酸分解物を含まないものが, あるいは 300 mg/l 添加したものが, 500 mg/l あるいは 1000 mg/l 添加した区より, 種子形成は少なかった。しかし, $4x \times 4x$ では逆に, 無添加があるいは 300 mg/l 添加の方が良かった。ココナットミルクの添加については, $2x \times 2x$ では 15% あるいは 20% 添加が 0% あるいは 10% 添加区よりも良く, 逆に $4x \times 4x$ では 0% あるいは 10% 添加の方が良かった。この実験に用いた Brassica の子房の人工培養においては, $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の両者に適した培地はなく, 交配組合せごとに適った最適培地が存在すると思われる。

交雑種子を得る組合せの $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ に

つりでは、計12粒の種子が得られた。2x x 4x
では9粒得られたが、カゼイン酸分解物を
500mg/l 加えただけの2から2粒得られた以
外はココナットミルクを15% 或いは20% 含む
培地から得られたものであった。4x x 2x では、
得られた種子の5粒のうち、1粒はカゼイン酸分
解物を300mg/l 含む培地からであり、他4粒はカ
ゼイン酸分解物を500mg/l と1000mg/l、ココナット
ミルクを10% 含む培地からであった。ニ
の二ことから多量種子を得るには、組合せ
とに達した最適培地が存在すると考えられる。

子房培養によるナプス型植物の育成

子房の人工培養の対照区として、自然条件
下における莢の長さ、種子稔性を調査した。
中野早生は各実験区において、莢の長さ、種
子稔性が異なっていた。特に種子稔性は0%
から78.9%まで著しい変異を示した。また野
崎中世とサクセツシヨニもその自殖において、
14.7%から81.1%と大きな種子稔性の変異を
示した。キャベツは他殖性作物であるので、

遺伝的に純系を保つことが困難であり、種子稔性の著しい変異は交配時の温度や品種の差異の他に、個体間変異も影響してゐることが考えられる。

また *B. cannestris* 群の対照区においても種子稔性は2.1%から93%と著しい変異を示した。同じニ寛自体菜の種子を用いたにも拘らず、種子稔性は16.7%~72.8%と大きな変異を示した。これらの変異もまた、交配時にあける温度や栽培品種による差異の他に、個体変異も関係してゐるものと思われる。

一般的に得られた種子の発芽率は種子稔性の良否に拘らず良かった。早生小松菜は高い種子稔性としたが、その発芽率は8.9%と著しく低かった。

試験管に植之込んだ当初の子房の長さは花粉親には関係なく、だいたひ♀ネに用いた植物によつて決まつてゐた。しかしキャベツでは約5mm、畑菜では約14mm、金町小蕪では約14mm、早生小松菜では約6mmの差が花

物親によつて理ゆれた。子房の生育は品種や個体の違いよりも、交配後の湿度に著しく影響されるものと思われる。

キヤベツの自殖において、交配後4日目の子房は全く全長せずに褐変してしまつたものが多数みられた。これは交配組合せによる不和合性のために、受粉を行なつても受精しなかつたものと思われる。

人工培養した子房の收穫時における莢の長さについて、多くの培地と品種について調査した。莢の生長は培地による差異を示さなかつた。また植之込み当初の子房の長さとの收穫時の莢の長さとの間には、はっきりした関係がなかつた。これに対して、自然条件下と人工培養したものの收穫時における莢の長さの間には、全般的に平行関係がみられた。

植物体から切り取つた切り口におけるカルス形成については、*B. campestris* 群では一般にカルス形成が豊く、培地に栄養物等を添加してもほとんどカルス形成はみられなかつた。一

オ B. oleracea 群ではカルス形成はよく、特にココナットミルクの添加が著しくカルス形成を促した。しかしその形成程度には大きな変異がみられた。カルスからの根の発生は多数観察された。

B. campestris 群と B. oleracea 群との自殖、交雑種子の形成について全体的にみると、両者とも自然条件下における種子形成と関連があるように思われる。自然条件下において種子形成の良かった交配組合せは人工培養においても種子形成がよかった。逆に自然条件下で種子形成の悪かったものは、人工培養においても良くなかった。また一般的に、B. campestris 群と B. oleracea 群の自殖を比較した場合、前者の種子形成のオが良かった。B. oleracea 群については同じ栽培品種を幾度か別の実験に使ったが、その度に種子稔性は変化した。これは、人工培養においても個体間差異があることを示すものと思われる。培養基組成による種子形成の差異は、はっきりとしなかった。つぎ

に、交雑子房の種子形成についていえば、
B. campestris (♀) x B. oleracea (♂) の交雑からは数
 種の種子が得られ、発芽して雑種植物を生じ
 た。しかしながら逆交雑の B. oleracea (♀) x B.
campestris (♂) においては、ほとんど種子の発
 達が見られず、未熟種子とて得られなかった。
 更に特徴的なことは B. campestris (♀) x B. oleracea
 (♂) の交雑においては、胚珠は発達せず胚だけが
 胚柄に付着した状態で "torpedo" 型から完熟
 胚の状態にまで発達したものがみられたことである。と
 くに後者の方がかなり多数得られた。これは
 基本培地のみならず、特にカゼイン分解物
 を 300 mg/l 添加した上でいちぢるしかつた。
 またイースト抽出物は Brassica の 2x x 4x 取りは
 4x x 2x の交雑種子を得るのにほとんど効果が
 なかった (Inomata 1968) が、ここでは 28% の
 添加によってかなり良い胚の発達を認めしめた。
 Nishi et al. (1959) は B. oleracea (♀) x B. campestris
 (♂) の交雑の困難とを解決するため、これらの
 胚を収る発達時期に取りよして胚培養を試み

雑種個体と得られる。しかし彼等の得た交雑
 個体はいつでも B. oleracea x B. campestris の組み
 合せからであり、この交雑からはまったく
 雑種と得ることが出来なかつた (Nishi et al.
 1959)。ここで行なつた B. campestris と B. oleracea
 の正交交雑においては、交雑種子および夏熟
 種子のように発達した胚も、これ等から得ら
 れた雑種個体も総て B. campestris (♀) x B. oleracea
 (♂) からであり、交雑においては胚珠の発達
 が初期の段階で終わつたと思われるものばかり
 しか観察されなかつた。通常、B. campestris
 と B. oleracea の交雑における胚発生は、いつも
 の交雑において胚の発達は胚珠の発達初期
 に止んでしまう (Håkansson 1956) のであるが、
B. campestris x B. oleracea の交雑において胚だけ
 認められたのは、この交雑の胚珠は発達初期
 においては、正常であることと示唆すると考
 えられる。胚珠の発達が進むにつれて、胚乳
 や種皮の発達が不十分となり、胚のみ正常に
 発達するものと考えられる。

收穫時に胚だけ良好に発達したものを胚培養して雑種を得た。胚培養した個体は全部で51個体であったが、生育した雑種は合計19個体であった。これは植物個体の発達の悪いのためでなく、夏の高温・多湿に起因すると考えられる。この点に注意を払えば更に多数の雑種個体を得ることは容易なものと考えられる。

Brassica napus ($2n=38$) は Brassica 属のカーライ類 (C ゲノム) とハクサイ類 (A ゲノム) の間の複二倍体植物であることは Morinaga (1929) によつて明らかにされ、U (1935) によつて最初には人為的につくられた。しかしながらカーライ類とハクサイ類の交雑は極めて困難であり、おびただしい数の交配を行なうと同時に、受粉法の工夫 (Hosoda 1961, Sarashima 1964) や接木 (Hosoda 1961) などが試みられてきている。また母体を倍数体にしてからの交雑や、二倍体と4倍体の交雑が試みられている。B. campestris 群と B. oleracea 群の交雑についでこの

今までの主な報告のうち、2倍体 *B. campestris* 群と2倍体 *B. oleracea* 群の交雑についてこの研究を Sarashima (1964) から引用して表79に示す(表79)。U (1935) の得た4個体の植物のうち、ナプス型の半数体雑種($2n=19$)は1個体で

Table 79. Historical review of the results of crosses between *B. campestris* and *B. oleracea**

Authors	No. of flowers pollinated(A)	No. of hybrids obtained (B)	B/A x 100
diploid ($n=10$) x diploid ($n=9$)			
U (1935)	732	4	0.545
Mizushima (1946) cal.	300	2	0.153
F (1955)	230	1	0.434
Hoffmann et al. (1958)	8330	20	0.240
Olsson (1960)	10359	16	0.153
Hosoda et al. (1961, 1963)	1121	22	1.962
Nishi et al. (1962)	4496	8	0.177
diploid ($n=9$) x diploid ($n=10$)			
U (1935)	380	0	0.0
Hoffmann et al. (1958)	9703	64	0.659
Olsson (1960)	4074	0	0.0
Hosoda (1961)	247	0	0.0
Nishi et al. (1962)	3187	0	0.0

* Sarashima (1964)

あり、他は $2n=29$ (aac), 28 (acc), および $2n=38$ (aacc) があった。これらの植物は父方または母方の2倍性の配偶子が交雑によつて受精し、出現したものと考えられる。Hosoda (1961) も B. campestris x B. oleracea から $2n=19$ (ac) の他に $2n=28$ (acc) を得ている。また Sarashima (1964) も B. campestris x B. oleracea の1,505花の交配から5粒の交雑種子を得たが、そのうち4個体は $2n=19$ (ac) で、他の1個体は $2n=29$ (aac) があった。B. campestris 群と B. oleracea 群の交雑の中でも特に B. campestris 群のなかのハクサイ (ssp. pekinensis (Lour.) Olsson) と B. oleracea 群のカンラン (var. capitata L.) の交雑は困難で、この組合せの成功例は Mizushima (1952) の4-7白菜 x サクセツシヨニ、および Hosoda (1961) の4-7白菜 x 野崎夏まきカンランの2例2個体があるにすぎない (Nishi et al. 1962)。B. oleracea x B. campestris の組合せにおいて多くの人々によつて種々の試みが行なわれているが、Hoffmann et al. (1958) が約1万花の交配から64個の雑種

を得ることはできなかった。また Nishi et al. (1962) も約3000花の交配を行なったが、交雑個体は得られず、これを胚培養する方法が試みられてきた (Nishi et al. 1959)

ここに示した実験の結果を表8-1のようにまとめると、B. campestris x B. oleracea の結果を表8-1に、B. oleracea x B. campestris の結果を表8-2にそれぞれ示した (表8-1, 表8-2)。新しいナブス型の植物を得るための子房の人工培養においては、ハクサイ x カーロン (B. campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Clsson x B. oleracea L. var. capitata L.) の組合せからは約30個体の幼植物を得て鉢植えし、そのうち7個体が生育した。また白菜 x カーロン (B. campestris (L.) ssp. chinensis (L.) Makino x B. oleracea L. var. capitata L.) からは15個体の幼植物を得、そのうち12個体が生育した。ところが比較的交雑種子の得やすいといわれるカブの類とカーロン類の交雑からは雑種植物を得ることは出来なかった。今まで困難とされていたハク

Table 80-1. Production of the hybrid plants in the crosses between *B. campestris* and *B. oleracea* by ovary culture

Cross	No. of flowers pollin- ated (A)	No. of hybrids obtain- ed (B)	B/A x 100
· diploid ($\underline{n}=10$) x diploid ($\underline{n}=9$)			
Hatana x Succession	59	0	0.0
Nozaki-hakusai x Nakano-wase	57	0	0.0
Kanamachi-kokabu x Nakano-wase	60	0	0.0
Nozaki-hakusai x Nakano-wase	129	8	6.20
Kyoto-hakusai x Nakano-wase	60	2	3.33
Wase-komatsuna x Nozaki-chusei	58	0	0.0
Nikanme-taina x Succession	56	12	21.43
Total	479	22	4.59

サイ類とカニラ類の交雑から得た雑種植物も、白菜とカニラの交雑から得た個体も総て $2n=19$ (ac) の要質半数体であった。本実験で成功した子房の培養方法を用いればナス型作物の育種に新しい局面が開ける可能性

Table 80-2. Production of the hybrid plants in the crosses between B. campestris and B. oleracea by ovary culture

Cross	No. of flowers polli- nated(A)	No. of hybrids obtain- ed (B)	B/A x 100
diploid ($\underline{n}=9$) x diploid ($\underline{n}=10$)			
Succession x Hatana	54	0	0.0
Nakano-wase x Nozaki-hakusai	58	0	0.0
Nakano-wase x Kanamachi-kokabu	55	0	0.0
Nakano-wase x Nozaki-hakusai	101	0	0.0
Nakano-wase x Kyoto-hakusai	60	0	0.0
Nozaki-chusei x Wase-komatsuna	60	0	0.0
Succession x Nikanme-taina	59	0	0.0
Total	447	0	0.0

がある。すなわち、B. campestris 群と B. oleracea 群の多様性を考慮すると、B. napus 型植物には大きく分けてつぎの3つが考えられる (Hosoda 1961) (1) 結球性ナプス、(2) 根菜ナプス、および (3) 油飼料ナプス。本実験結果は、

(3) 型のみならず(1), (2)型ナブスの育成に大きな可能性を開くものである。

(iii) 交雑不適合性の生理学的研究

子房の培養条件の検討

Nitsch (1951), White (1963), Heller (1953) と Murashige and Skoog (1962) の各々の培地を基本にして, アミノ酸, ビタミン等の有機物を添加した種々の培地に *B. campestris* の2倍体, 栽培品種名雪白体菜, と同質4倍体, 栽培品種名野崎白菜の子房の人工培養を試み, 種子形成等について調査した。全般的に $2x \times 2x$ の種子稔性のものが $4x \times 4x$ のそれよりも良いように思われた。無機塩の濃度差と收穫時における長さについてこの関係はみられず, むしろ栽培品種による差異があった。種子稔性についてみると, 無機塩の濃度差による違いがあった。white, Nitsch 等の比較的無機塩の濃度の低い培地の

方が、比較的高濃度の Heller, 特に Murashige and
 Skoog の培地よりも種子稔性は良好であり、
 これ等の種子の発芽率も低くなかった。特に 2x
 の自殖の W-2 と W-3 においては、他に較べて
 良かった。4x の自殖では、MS-62 を除いて、N-1
 の種子稔性も良かったが、その発芽率が悪く、
 W-1, W-2 の方がよい結果になった。無機塩の
 基本培地に White の有機物、Morel の有機物或
 は両者を混合したものの等についてみると、
 これらの有機物を添加しないものでも、いずれ
 の区においてもかなりの種子稔性がみられ、
 N-1, W-1 と H-1 では高かった。Nitsch, White,
 Heller についてみると、有機物の添加が多種
 類になるとかえって種子形成は低くなる傾向
 を示した。しかしながら MS-62 の場合には、有
 機物の添加が多くなると 2x, 4x のいずれにお
 いても種子形成が上昇した。特に 4x の場合は、
 他の培地の種子形成と較べて良好な種子形成
 がみられた。

胚培養, 特に幼胚と胚珠から取り出して培

養するばかりには、無機塩に糖を添加し下培地は勿論、種々のアミノ酸等の有機物を添加し下培地においても、生育を続けさせる物体に生長することは非常に困難である。基本培地にココナットミルクを添加すると、幼胚の生長を著しく助け、植物体まで生長させることが出来る。ココナットミルクには幼胚を生長させる物質 "embryo factor" が存在している (Van Overbeek et al. 1942)。この研究を発端にして、"embryo factor" の研究が盛んになり、種々の植物の抽出物や、イースト抽出物、麦芽抽出物等の幼胚に対する効果が研究されてきた。このように幼胚の人工培養には各種のアミノ酸を添加しても、生育は十分でない。Daucus carota のカルスでは、IAAの他にサイアミンとニステインを含む培地で12年間の継代培養が可能であるのに、Salix のカルスの培養では、18ヶ月たつと枯死してしまう。Daucus carota のカルス培養の培地にカルシウムペントテニ酸とビオチンを加えると長期培養が可能となる。

(Gautheret 1950)。またタバコの髓からのカルスではサイアミンが必須であり、その上イノシトールを添加するとカルスの増殖は著しくなる (Linsmaier and Skoog 1965)。このように組織培養に用いられる培地にはサイアミンの添加が必須であり、その他カルスの種類によって添すべき有機物が各々多少異なっている。

ここで行なつた Brassica の子房の人工培養においては、糖と無機塩だけの培地でも種子形成がみられた。また MS-62 を除くのは、多くの種類の有機物の添加は阻害的に作用すると思われた。無機塩の比較的うすい White の培地を基本培地に用いるのが好ましいと思われる。

糖濃度と種子形成に関しては、 $2x$ の自殖と $4x$ の自殖においては多少異なつてはたが、 $2x \times 2x$ では 1 リットル当たり 30g の蔗糖のとき最も良い種子形成がみられ、 $4x \times 4x$ では 50g のとき良い種子形成がみられた。培地に添加される糖濃度が低い場合 (10g/l)、或いは高い場合 (70g/l, 90g/l) のいずれにおいても、種

子形成の低下がみられ、特に $4x \times 4x$ においては効果が著しかった。

Daucus carota の組織培養における糖濃度とカルスの生長の割合をみると、3% 蔗糖の場合が一番生長が良く、それより高濃度になると生長は抑えられた (Gautheret 1959)。また Zea mays の胚乳からのカルスの生長で、蔗糖 2% のとき生体重が最高であつたが、乾物量は 8% のときに最も高い値を示した (Straus and La Rue 1954)。

Brassica の子房の人工培養において 3% から 5% の糖濃度が好ましいと思われた。

光の条件についての子房の人工培養では、300-500 ルクス of 光の状態の時から最も良く、暗黒状態、変温での室温状態、2000 ルクスと与えた状態はどれも劣つてゐた。暗黒状態から得られた $4x \times 4x$ の種子は 1 粒も発芽しなかつた。2000 ルクスという光は Brassica の子房の人工培養においては、光による物質の消費の方が大きくなるためと思われる。

交配後 1 日目から 10 日目まで順に日を追つ

て人工培養を試み、種子形成の割合とみてが、培養する時期が遅くなるに従って種子形成の割合は上昇する傾向にあつた。 $4x \times 4x$ では交配後5日目からは種子形成は順次よくなつたが、4日目までは交配後1日目よりその割合は劣つてゐた。

胚珠或いは子房の人工培養によつて、種子形成を調べた研究には多数の報告がある。それの中には日を追つて種子形成の割合を調べてたものは見当らな。Nakajima (1970) のまとめで最近の報告によると、胚珠培養の成功例は受粉後の日数で見ると、それらのほとんどが4日目以後であり、その時の胚の発達状態は球型状のものである。胚の細胞数が4細胞以下であるものは僅かに存在するだけである。

Brassica の交配後の胚発生についてみると、交配後1日目にあつては、 $2x \times 2x$ では未だ受精の行なわれな胚珠は見当らず、 $4x \times 4x$ では10個の子房を調べたなかで僅かに2粒の胚珠が受精してゐた。3日目において、胚は1〜

2細胞の状態であつた(Nishiyama and Inonata 1966)。Brassicaの子房の培養に於いては、交配後1日目から発芽種子を得た。Brassicaにおいて今まで行なわれてきた培養時期よりも、更に発達初期の未受精の状態からの培養が可能となつた。

胚珠の培養において、生育種子を得るには、胎座を付けたまま培養するか否かが大きく影響し、胎座を付けた場合に良い種子形成をみた(Nakajima and Matsumoto 1969)。更に(Nakajima 1970)は胚珠の培養での胎座の役割の重要性を論じている。Brassicaにおいても交配後9日目の胎座から胚珠を取りはさし、無天培地上で培養した胚珠から発芽する種子は得られなかった(A-2-iii)。また無天上に置床した胚珠を交配後15日目に固定し、胚珠の発達状態を調べたものでも、培地上に置床してからの胚珠の中の胚・胚乳の発達はほとんどなかった(A-1-ii)。ここで行なつた実験では、受精以前の状態から培養した場合においても発

芽種子が得られ、交配後9日目では $2x \times 2x$ で 59.5%, $4x \times 4x$ で 16.7% の種子を得た。その 93% と 81% の種子がそれぞれ発芽した。

Brassica においても, Nakajima (1969, 1970) が指摘
あるように胚珠の発達初期は, 胚珠が胎座に
付着してゐることから種子形成に大切であると
推測される。

交雑不適合性における遊離アミノ酸の消長

胚珠の発生初期の崩壊に供する遊離アミノ
酸の消長を調べた。対照として $2x \times 2x$ と $4x$
 $\times 4x$ を調べた結果, お互いの間の遊離アミノ
酸に量的な差異がみられた。これは倍數性の
違いによるもの, 或いは栽培品種の違いによ
るものと思われる。 $2x$ と $4x$ の正逆交雑の組織学的
観察によれば, $2x \times 4x$ では交配後12日目から
胚乳の崩壊が起つてくるが, 一方 $4x \times 2x$ では
交配後6日目には胚乳の膜形成が始まり,
9日目では胚は球型にも拘らず, 胚乳全体の
膜形成が観察され, 12日目になると崩壊が著
しく起つた (Nishiyama and Inomata 1966)。このよ

うに形態的な変化をみると、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ における種子崩壊は全く別のものと考えられたが、遊離アミノ酸の段階では、この両者の種子崩壊の現象が類似していた。遊離アミノ酸の中でも特にメチオニンとバリン、とロイシンにおいては著しい量的変化がみられたが、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の遊離アミノ酸の著しい量的変化はメチオニンとバリン、とロイニンであり、種子崩壊の時期と組織学的な観察から考慮すると、その消長は類似していた。 $4x \times 2x$ の12日目では、遊離アミノ酸の検出が少なかったが、これは胚珠全体が枯死に近づいているためである。

Triticum と Zea の雄性不稔の系統の花粉の遊離アミノ酸を調べると、正常のものに較べ、アスパラギン酸が異常に増加して、プロリンの減少がみられた (Fukasawa 1954)。Brassica の交雑不稔の場合にはメチオニンとバリン、とロイニンが急激に増加したので、雄性不稔の現象とは異なっていた。

交雑不稔におけるメチオニンとバアリン、
とロイシンの関係が明らかになつたが、これ
等の遊離アミノ酸の蓄積は、アミノ酸から蛋
白質への取り込みが阻害されるために生じる
のか、或いは胚・胚乳の崩壊に伴つて、蛋
白質が分解するために生じるのかは明らかに
できなかった。

B Raphanus sativus L. の 2 倍体とその同質 4 倍体の交雑不適合性に関する研究

(1) 胚発生学的研究

Brassica campestris の 2 倍体 ($2n=20$) とその同質
4 倍体 ($2n=40$) の正逆交雑では、いずれも受精
後或る程度の胚の発達は見られるが、途中で
胚珠が崩壊し生育出来る種子の形成はみられ
ない (Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus sativus に
おいては $2x(\text{♀}) \times 4x(\text{♂})$ では交雑種子が得られず、
 $4x(\text{♀}) \times 2x(\text{♂})$ では小さい生育出来る種子が得ら
れた (Nishiyama 1952a, b)。しかしながらこの胚発

生学的研究はまだ存在してゐない。

こゝでは Raphanus sativus の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交雑における胚発生と、発生学的並びに組織学的に観察した。

材料および方法

Raphanus sativus L. の 2 倍体と同質 4 倍体の 1 栽培品種、聖護院大根を用いた。用いた交配組合せは $2x \times 2x$, $2x \times 4x$, $4x \times 4x$ および $4x \times 2x$ である。除雄後 2 日目にかうす室内で新鮮な花粉を用いて開花受粉したのち、交配後 3 日, 6 日, 9 日, 12 日, 15 日, 18 日と 21 日目に子房を固定し、パラフィン埋蔵後 11~15 μ のパラフィン切片をつくり、ハイデンハイム鉄ヨバンフマトキシリンで染色し、検鏡した。固定、パラフィン埋蔵、染色の方法、検鏡のスケッチ等は、Brassica の組織の観察と同じ方法を用いた。

結 果

交雑結果

正逆交雑とその対称区の自然条件での種子稔性を成熟莢を用いて調査した(表81)。

Table 81. Results of crosses between diploid and tetraploid Raphanus sativus

Cross combination	No. of flowers pollinated	No. of capsules examined	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Av. capsule length (mm)
$2x \times 2x$	37	32	148	85.2	57.0
$2x \times 4x$	36	35	1*	0.5	45.8
$4x \times 4x$	6	6	9	75.0	38.3
$4x \times 2x$	7	7	7**	70.0	33.9

* One seed was diploid.

** All seven seeds were hybrid.

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ は種子稔性が良く75%以上であった。 $4x \times 2x$ については7つの莢を調べ、7粒の発芽種子を得た。種子稔性は70%であった。逆交雑の $2x \times 4x$ については35莢を調べたが、受精して成る程度胚珠が発達したと思われる不良種子(いずれも発芽せず)が多数

クを添加したものは良かった。得られた種子は、 $2x \times 2x$ で 8 粒、 $2x \times 4x$ で 1 粒、 $4x \times 4x$ で 8 粒、 $4x \times 2x$ で 15 粒であった。得られた種子の発芽率は 50% から 100% の間であったが $2x \times 4x$ から得られた種子は $2x \times 2x$ 或いは $4x \times 4x$ と同じ大きさで充実にしてゐるが不発芽であった。また $4x \times 2x$ の交雑からはいずれの組み合わせよりも良い種子稔性が得られたが、これは充実種子の大きさが早熟型 ($2x \times 2x$, $4x \times 4x$) の約 $1/4$ の大きさのため、限られた環境では早熟種子が得やすいと考えられた (図 30)。

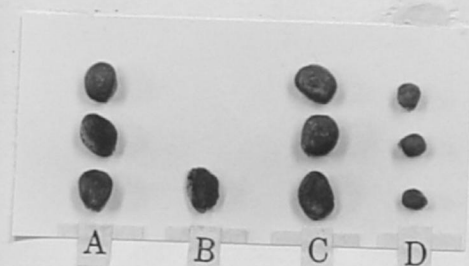


Fig. 30. Seeds produced by ovary culture.

- A: $2x \times 2x$.
 B: $2x \times 4x$.
 C: $4x \times 4x$.
 D: $4x \times 2x$.

(3) 考察および
 論議

胚発生学的研究

$4x \times 2x$ から得られ

る *Raphanus sativus* の 3

倍体雑種は生育して、

雑種植物をつくった。この交雑から得られた

の数も表82に示す(表82)。球型胚までの発達については胚全体を測定した。それ以後の胚については子葉部分になるべき部分を除いた残りの部分の大きさを測定した。4つの組み合わせの胚の発達状態には、交配後12日目までは差異がみられなかった(図26)。

Table 82. Number of ovules used for studying growth rate of embryo

Cross	Days after pollination						
	3	6	9	12	15	18	21
$2x \times 2x$	0	4	7	7	3	3	4
$2x \times 4x$	1	3	7	10	2	1	2
$4x \times 4x$	1	6	6	4	4	2	2
$4x \times 2x$	1	8	9	5	5	3	1

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の胚は12日目以後は急速に大きくなったが、 $2x \times 4x$ の発達は15日目以後は止まってしまい、或る胚珠では胚は消失してしまっていた。 $4x \times 2x$ では $2x \times 2x$ 或いは $4x \times 4x$ に比べて15日目では発達が遅くもなっていた。18日以後では、 $4x \times 2x$ の胚の発達はほとんど止まってしまったが、 $2x$ と $4x$ の胚は正常に生育を

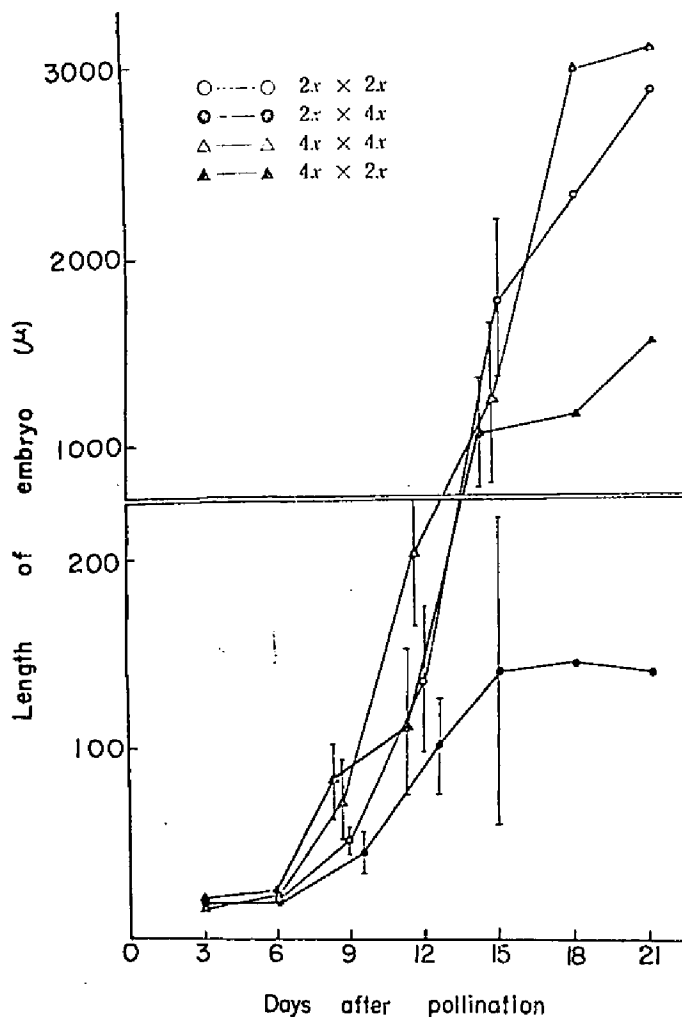


Fig. 26. Growth rates of embryos in reciprocal crosses between $2x$ and $4x$ of *Raphanus sativus*, —: 95% fiducial interval.

続けられた。交配後21日目では、3つの交配($2x \times 2x$, $4x \times 4x$, $4x \times 2x$)において胚は見成したが、 $4x \times 2x$ の胚の大きさは両親($2x$ と $4x$)の大きさの約半分であった。胚の発達について、種

種と両親の明瞭な差異は、 $2x \times 4x$ では12日目
に、 $4x \times 2x$ では15日目に現われることが分か
った。

交雑種子の発生学的研究

I. $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$: 通常1つの子房に
は4つから6つの胚珠が含まれてゐるが、交
配後3日目には、そのうち1つから4つの胚
珠が受精してゐた。受精してゐた胚珠の中で、
1細胞の接合体が観察出来たのは唯1つの胚
珠だけで、後は胚の状態は分らなかつた。

交配後6日目になると、胚の細胞数は $2x \times$
 $2x$ で3から8細胞、 $4x \times 4x$ で4から8細胞に
発達してゐるのが観察された。胚乳は全体に
僅かしか発達してゐないが、胚の周り、特に
胚柄の周りは胚乳の発達が良かった(図27a,
e)。

交配後9日目では、 $2x \times 2x$ の胚は球型で
その細胞数は、中心の胚軸に添つて縦が5から

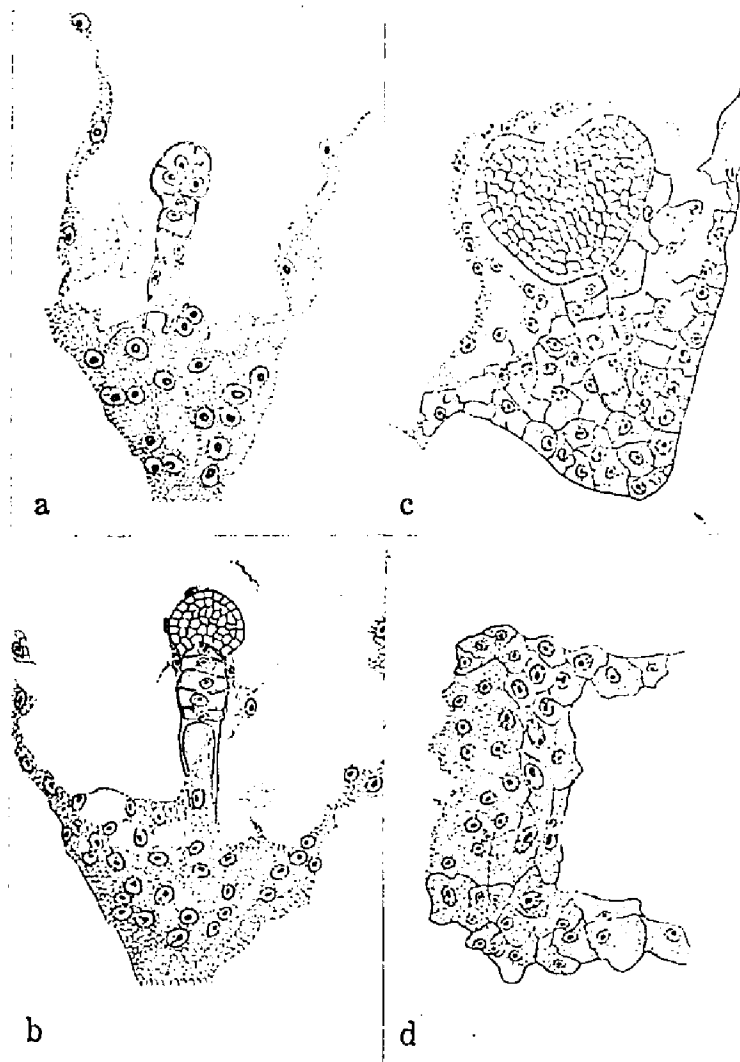
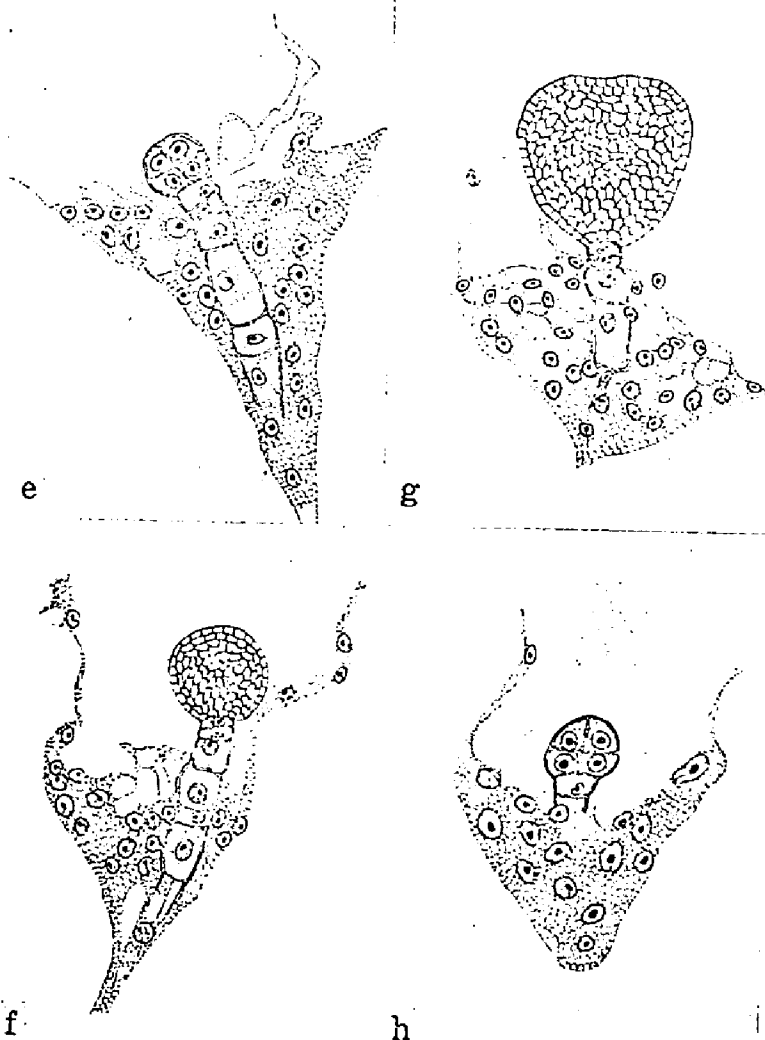
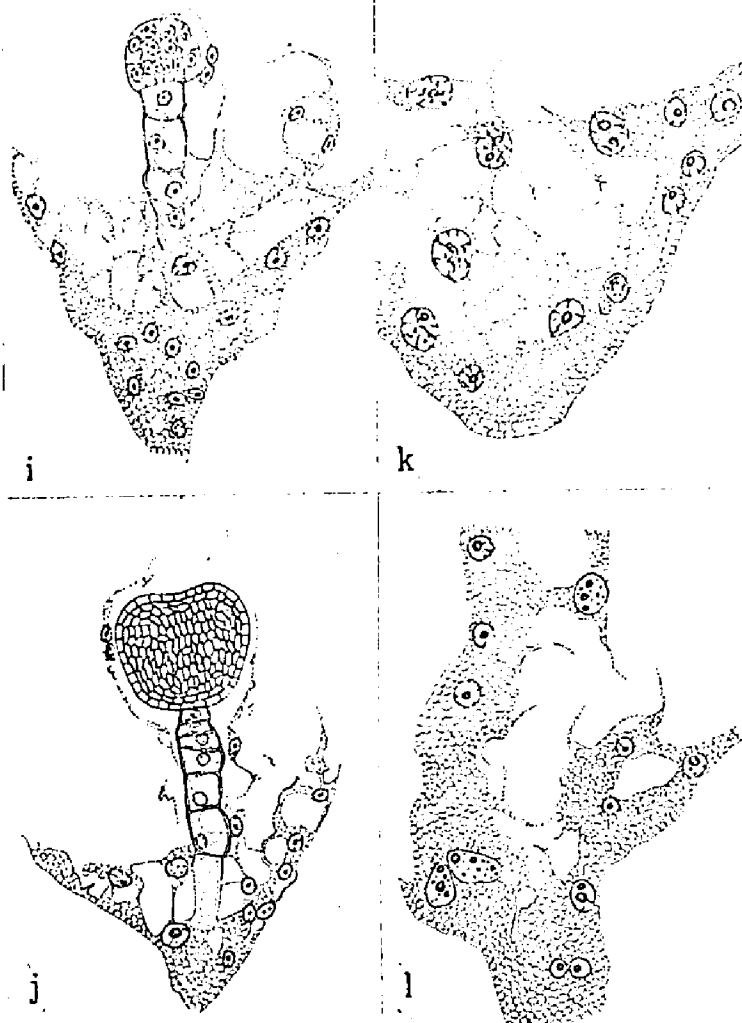


Fig. 27. Embryo and endosperm in various developmental stages.

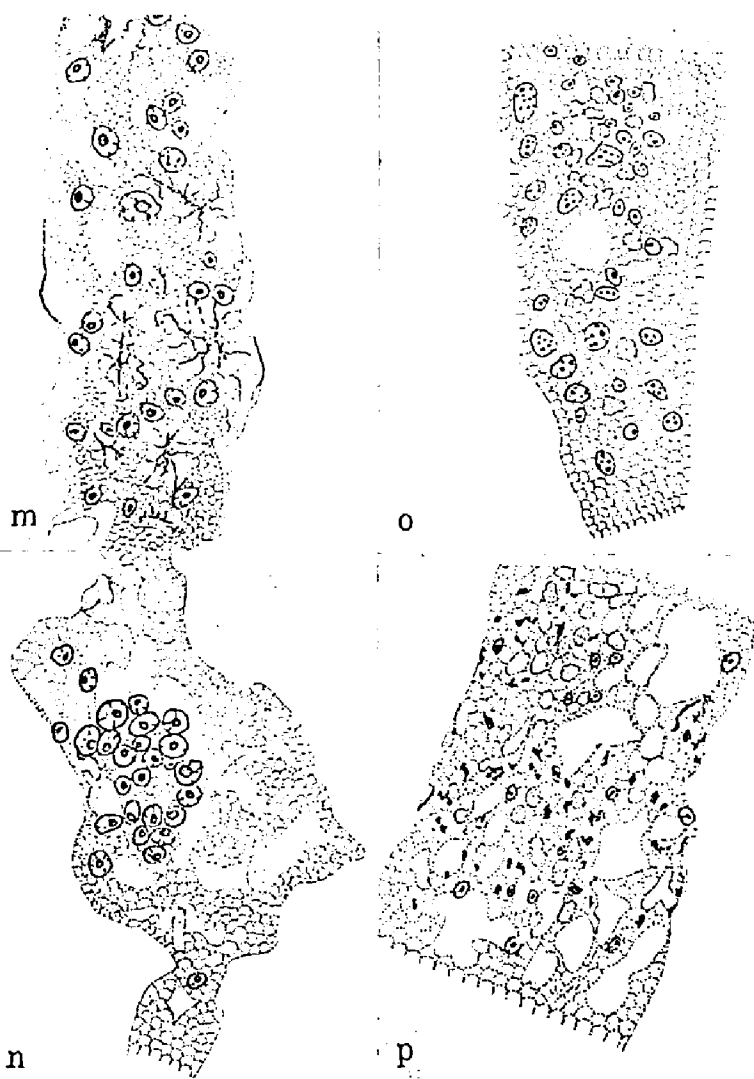
- a: $2x \times 2x$, 6 days after pollination; 4-celled proembryo.
- b: $2x \times 2x$, 9 days after pollination; Embryo at globular stage.
- c: $2x \times 2x$, 12 days after pollination; Heart-shaped embryo and cell wall formation in the endosperm.
- d: $2x \times 2x$, 15 days after pollination; Partial cell wall formation of basal endosperm.



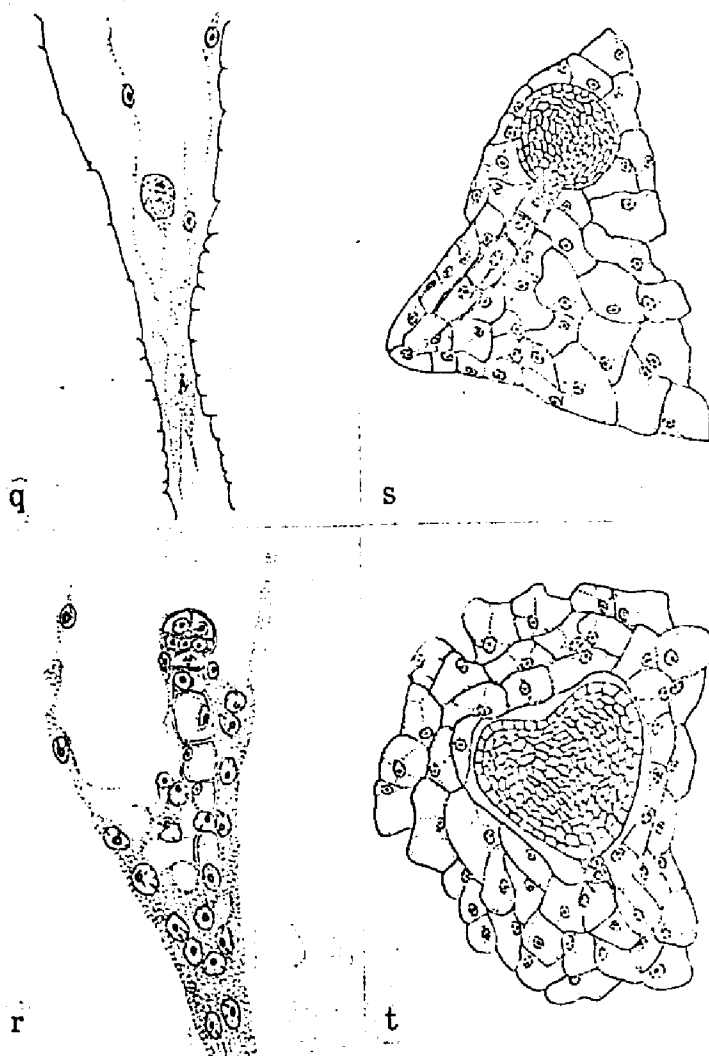
- e: $4x \times 4x$, 6 days after pollination; 4-celled proembryo.
 f: $4x \times 4x$, 9 days after pollination; Embryo at globular stage.
 g: $4x \times 4x$, 12 days after pollination; Pre-heart-shaped embryo and cell wall formation occurred in endosperm near the embryo.
 h: $2x \times 4x$, 6 days after pollination; 4-celled proembryo.



- i: $2\times \times 4\times$, 9 days after pollination; Degeneration occurring in endosperm.
- j: $2\times \times 4\times$, 12 days after pollination; Conspicuous degeneration occurring in endosperm.
- k: $2\times \times 4\times$, 12 days after pollination; Extremely large nuclei observed in endosperm near embryo.
- l: $2\times \times 4\times$, 12 days after pollination; Abnormal nuclei found in other parts of endosperm.



- m: $2\times \times 4\times$, 15 days after pollination; Collapsed endosperm.
- n: $2\times \times 4\times$, 15 days after pollination; Nuclei gathered in a particular part.
- o: $2\times \times 4\times$, 15 days after pollination; Nuclei varying in size.
- p: $2\times \times 4\times$, 18 and 21 days after pollination; Collapse of endosperm in all parts of the ovule.
- q: $4\times \times 2\times$



- q: $4x \times 2x$, 3 days after pollination; One-celled proembryo.
- r: $4x \times 2x$, 6 days after pollination; Vacuoles in endosperm near embryo.
- s: $4x \times 2x$, 9 days after pollination; Embryo at globular stage and cell wall formation in endosperm.
- t: $4x \times 2x$, 12 days after pollination; Embryo at heart-shaped stage and cell wall formation in endosperm.

9細胞, 横が4から8細胞であり, $4x \times 4x$ では縦方向に4から12細胞, 横方向に4から7細胞が各々数えられた。胚乳は全体的に発達しているが, 胚珠自身が大きくなつてきているので, 胚乳核は胚のうの内側に沿つて1つ2個に並んでいるだけで, 中央部は大きな空胞のまま残されてゐた。胚乳の膜形成は胚および胚極の周辺部にありともみられなかった(図27b, f)。

交配後12日目では, 胚は $2x \times 2x$ および $4x \times 4x$ において分化を始めているのが観察された。球型から"heart"型になった胚の回りでは胚乳の膜形成が始まつてゐた(図27c, g)。

$2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ のよく発達した胚は"early torpedo"期に達し, それらの胚乳の膜形成は"basal endosperm"の部分を除いて全面に起つてゐた。

15日目になると, 11ずれの交配においても胚は著しく発達し, "late torpedo"型から"upturned U"型にまで達するものが見られた。

しかし胚珠によつて胚の発達に遅れがみられた。胚乳の膜形成は全面に広がり、発達のよい胚を持つ胚珠の "basal endosperm" は一部膜形成を起して11子のが観察された (図27d)。

18日目と21日目になると、胚の発達は更に著しく、"upturned U" 型からほとんど成熟した胚にまで達した。特に子葉部分の生長が著しく、ほとんど成熟した胚は胚珠全体を埋めこいた。これらの胚珠では胚乳は著しく退化し全体にわたつて膜形成した "basal endosperm" と共に、僅かしか存在しなかった。

II. $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$: 交配後3日目に観察した1子房の中は1~5個の受精した胚珠がみられた。これらの胚の発達状態は観察しにくかったが、11ずれの交雑でも1個の胚珠と接合体の状態が観察された (図27g)。

6日目には、胚の細胞数は $2x \times 4x$ では2から4細胞となり、 $4x \times 2x$ では4から8細胞が観察された。対照区 ($2x \times 2x$, $4x \times 4x$) の胚の細胞数と較べると $2x \times 4x$ の胚の発達は少し遅れて11

るようには思われず。胚乳の発達には胚および胚柄の周りの胚乳以外は全体的に僅かしか発達してゐなかつた。 $2x \times 4x$ の胚乳においては対照とのそれと変わりかゝなかつた(図27f)が、 $4x \times 2x$ では胚の周りの胚乳に多少空胞化がみられた。これは胚乳の膜形成と関係があるように思われる(図27g)。しかし膜形成はこの段階でははっきりとは観察されなかつた。

9日目になると、胚の発達状態は $4x \times 4x$ 、 $4x \times 2x$ のオが $2x \times 2x$ 或いは $2x \times 4x$ よりもよかつた(図26)。胚は球型でその細胞数は $2x \times 4x$ では中心の胚軸に沿つた縦方向では5から9細胞、横方向では4から9細胞であり、 $4x \times 2x$ の胚では縦が12から15細胞、横が14から15細胞であつた。このことから胚の発達程度は $4x \times 2x$ のオがよいことが分かつた。胚乳の発達に関しては、 $2x \times 4x$ では胚、特に胚柄の周りで胚乳の崩壊が始まるのが観察された(図27i)。この場合、図27cや図27gと同じような空胞化がみられたが、後者の空胞の

周囲には胚乳核が存在してゐるので、膜形成の起る前段階のものであると考えられるが、前者の場合には、空胞化した胚乳の周りにはどこにも核が見出されなかつた。——逆交雑の $4x \times 2x$ の胚乳は胚が球型であつても全面にわたつて膜形成が観察された (図275)。

12日目になると、 $2x \times 4x$ の胚においては球型から、最も良く発達したものの2"late torpedo"型のものまでみられ、球型の胚のうちには、細胞数が縦が8細胞、横が8細胞という交配後9日目からほとんど発達してゐない胚を持つ胚珠も観察された。 $4x \times 2x$ の胚では発達のよい球型から "torpedo" 型までの胚がみられた。胚乳の状態は $2x \times 4x$ では、胚の周りの胚乳では崩壊が更に進んで空胞化が目立つてきた (図276)。いずれの胚の周辺の胚乳にも同じように崩壊する胚乳がみられた。また胚乳核の大きさと著しく異なるものが胚の周辺部 (図276) や、胚珠中に僅かに存在する胚乳でも観察された (図276)。これは核分裂の

異常，核の融合等によつて處理したものである。4x x 2x の胚乳ではどの胚珠でも膜形成がみられ（図27a）。

15日目には，2x x 4x の胚の発達は完全に止まつてしまつたように思われる（図26）。組織学的觀察にあつても交配後12日目に見られたと同じ球型或いは "heart" 型の胚が觀察された。一方 4x x 2x にあつては，胚の大きさは対照（2x, 4x）のそれよりも多少小さいが，形態的にはほとんど成熟に近しい胚から "upturned U" 型までと，対照の交配後18日目から21日目にみられるような胚が胚珠中に存在した。胚珠全体が小さいので，それらのよく発達した胚は胚珠中一杯に広がつてゐた。胚乳の状態は 2x x 4x では膜形成はみられず部分的に著しい崩壊を起してゐるもの（図27m），胚乳の機能を失つて残存する核が極在してゐるもの（図27n），また全体的に大小さまざまな核が散在してゐる胚乳（図27o）等，種々の異常が觀察された。一方 4x x 2x では胚の発

速に伴つて、膜形成され胚乳は対照区の胚の発達との18日目或いは21日目と同じように僅か残つてゐるだけであつた。また "basal endosperm" の全部にわたつて膜形成もみられた。

18日目と21日目では $2x \times 4x$ の胚は12日目のものとその発達程度が変わらず、球型と "heart" 型の胚が胚珠中に存在してゐるのがみられた。 $4x \times 2x$ の胚は対照区のものに較べ発達の速度が著しくなかつたが、ほとんど成熟した胚が観察され、その大きさは対照区の約半分であつた(図26)。胚乳に關しては $2x \times 4x$ では種々の異常がみられた。交配後12日目なりし15日目にかけて部分的にみられた胚乳の崩壊消失が全体にわたつて起こつてきてゐるのがみられた(図27p)。また胚乳の崩壊が著しいので既に胚珠中に胚乳の存在してゐないものも観察された。 $4x \times 2x$ ではほとんど成熟した胚のため膜形成を起した胚乳は既にほとんど存在せず、胚珠内部と胚が全部占めてゐるのがみられた。

各交雑における胚乳の発達段階の変化を表
83にまとめ示す(表83)。

Table 83. Embryo and endosperm development in 3-21 days after pollination in the $2x$ and $4x$ parents and their reciprocal hybrids

Cross	Days after pollination					
	3	6	9	12	15	18 and 21
<i>Embryo</i>						
$2x \times 2x$		globular shape		globular~ early "torpedo"	"walking stick"	"upturned U"
$4x \times 4x$		"		"	late "torpedo"	"
$2x \times 4x$		"		globular~ heart shape		
$4x \times 2x$		"		globular~ early "torpedo"	globular~ early "torpedo" (almost disintegrated)	"upturned U"
<i>Endosperm</i>						
$2x \times 2x$		developing endosperm		initiating cell wall formation	cell wall formation throughout	digested
$4x \times 4x$		"		"	"	"
$2x \times 4x$	developing endosperm		initiating abnormal vacuoles	beginning to collapse		abnormalities of nuclei and cytoplasm
$4x \times 2x$	"			cell wall formation throughout		digested

(2) 子房の人工培養

B. campestris の2倍体と之の同質4倍体の正
交雑には、11種の組み合わせにおい
ても交雑種子は得られず (Nishiyama and Inomata
1966)。また *Raphanus sativus* の2倍体と之の同質

4倍体の正交交雑において、 $2x \times 4x$ では交雑種子は得られないが、 $4x \times 2x$ では $2x \times 2x$ あるいは $4x \times 4x$ の交配種子の約 $1/4$ の大きさの充実種子が得られる (Inomata 1970)。また B. campestris と B. oleracea の種間交雑においても種子の発達は途中で止んで不稔種子になる (Håkansson 1956)。Brassica における不稔種子の形成の組み合わせにおいて、子房の発達初期からの人工培養を試みて、交雑種子および雑種植物を得た (A-II-iv)。

これらの結果に基づいて、Raphanus sativus においても子房の人工培養を試みた。

材料および方法

Raphanus sativus L. 栽培品種、みの早生大根の2倍体と同質4倍体を実験に供した。交配組み合わせは、 $2x \times 2x$ 、 $2x \times 4x$ 、 $4x \times 4x$ および $4x \times 2x$ の4通り、交配は除雄後2日目には開花した花に、新鮮な花粉を用いて行なった。

子房の人工培養には Nitsch (1951) の基本培地に
 フグリニン, ナイアシン, ピリドキシン, サ
 イアミンを添加したものを基本培地とした (A-II-III)。
 子房の培養にはこの基本培地に
 イースト抽出物, カゼイン酸分解物, ココナ
 ットミルク等を添加した (表 84)。

Table 84. Composition of media supplemented with yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk for culturing ovaries

Basal only	Yeast extract (g/l)		Casein hydrolysate (mg/l)		Coconut milk (%)	
	2	10	300	2000	10	30
B-1	YE-1	YE-2	CA-1	CA-2	CM-1	CM-2

子房の培養時期は, Brassica の場合と同じように交配後 4 日目のものを用いて, 植物体から切り取り, 投薬後試験管に植えておく (図 28)。また植えておく後の条件等は A-II IV の場合と同じである。

結

果

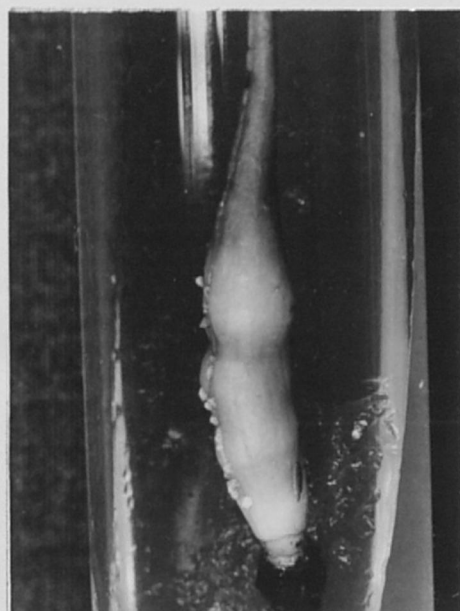


Fig. 28. Explanted ovary in test tube.

自然条件下における交雑結果

自然条件下における交雑結果を表85に示す(表85)。2x x 2x において、莢の長さは61.4 mm と11粒の組み合わせよりも長かった。得られた種子は 2x x 2x 2" 40粒, 4x x 4x 2" 19粒,

4x x 2x 2" 10粒であった。種子発性は 2x x 2x と 4x x 4x はいずれも86%以上であり, 4x x 2x 2"

Table 85. Results of crossing experiments under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	11	61.4	40	87.0	92.5
2x x 4x	6	48.5	0	0.0	-
4x x 4x	11	46.5	19	86.4	84.2
4x x 2x	10	39.7	10	47.6	70.0

42.6%と低かったが、小粒の充実に種子が得られた(図25D)。4x x 2x から得た種子の発芽率は70%とかなり良かった。尚種子稔性は收穫した莢の胎座の数の平均を基礎として求めた。2x と 4x のいずれを母方にしたときにも胎座数を1莢当たり4個とした。

培養時における子房の長さ

交配後4日目には子房を植物体から切り取って人工培養したが、その時の子房の長さを表86.に示す(表86)。2x x 2x と 2x x 4x とにおいてほぼほとんど差異はなく、4x x 2x では最も長い21.3mm

Table 86. Average length of explanted ovary

Cross	No. of ovaries examined	Average length of ovary (mm)
2x x 2x	15	15.3
2x x 4x	15	15.9
4x x 4x	16	18.0
4x x 2x	16	21.3

であった。

子房の人工培養

による種子形成

子房の人工培

養による種子形成の結果を表87に示す(表87)。表87-1は $2x \times 2x$ と $2x \times 4x$ の結果で、表87-2は $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の結果である。各2個の子房を植えた。平均の莖の長さは $4x \times 2x$ において最も長く、 $4x \times 4x$ で最も短かった。培養基組成の差による莖の長さの相違はみられなかった。植物体の切り口のカルス形成の程度については図29に示す(図29)。いずれの交配組み合わせについても、ココナットミルクを30%添加した培地では非常に良いカルス形成がみられた。他の培地組成

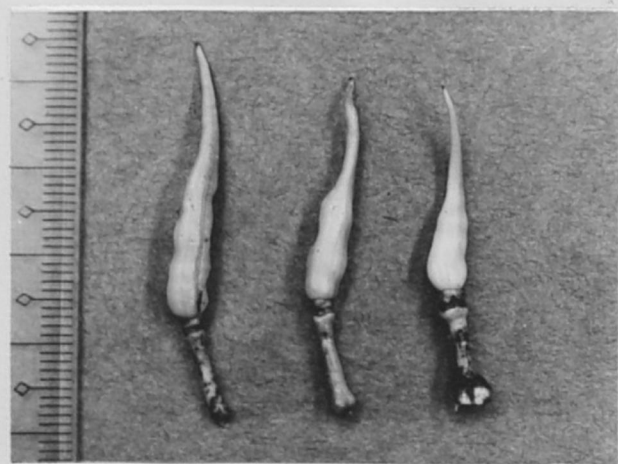


Fig. 29. Callus formation at the cut end of cultured ovaries, left to right; -, +, ++.

の区においては、カルス形成はほとんどみられなかった。種子形成についてみると、対照区においても種子形成はみられた。

カゼイン酸分解物とココナットミルク

Table 87-1. Effects of yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk on cultured ovaries in the cross of $2x \times 2x$ and $2x \times 4x$ of Raphanus sativus

Cross	Medium ¹⁾	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
$2x \times 2x$	B-1	7	7	24.4	+	4	14.3	50.0
	YE-1	7	7	21.7	-	0	0.0	-
	YE-2	7	7	21.3	-	0	0.0	-
	CA-1	7	6	26.0	+	0	0.0	-
	CA-2	7	7	25.7	+	0	0.0	-
	CM-1	7	7	21.1	+	2	7.1	50.0
	CM-2	7	7	24.4	+++	2	7.1	50.0
Total		49	48	23.5		8	4.2	50.0
$2x \times 4x$	B-1	7	7	23.9	+	0	0.0	-
	YE-1	7	6	24.7	-	0	0.0	-
	YE-2	7	7	20.3	-	0	0.0	-
	CA-1	7	7	25.1	+	1	3.6	0.0
	CA-2	7	7	30.6	+	0	0.0	-
	CM-1	7	7	27.4	+	0	0.0	-
	CM-2	7	7	24.9	+++	0	0.0	-
Total		49	48	25.3		1	0.5	0.0

1): Refer to Table 84.

Table 87-2. Effects of yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk on cultured ovaries in the cross of $4x \times 4x$ and $4x \times 2x$ of Raphanus sativus

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
$4x \times 4x$	B-1	7	7	21.6	-	2	7.1	50.0
	YE-1	7	7	19.1	-	0	0.0	-
	YE-2	7	7	20.9	-	0	0.0	-
	CA-1	7	7	23.0	-	2	7.1	50.0
	CA-2	7	7	21.1	-	1	3.5	100
	CW-1	7	7	22.4	+	1	3.5	100
	CW-2	7	7	24.3	+++	2	7.1	50.0
	Total	49	49	22.7		8	4.1	62.5
$4x \times 2x$	B-1	7	7	28.1	-	4	14.3	50.0
	YE-1	7	7	27.1	-	2	7.1	50.0
	YE-2	7	7	22.7	-	0	0.0	-
	CA-1	7	7	29.7	-	2	7.1	50.0
	CA-2	7	7	30.4	-	2	7.1	100
	CW-1	7	7	30.1	+	5	17.9	80.0
	CW-2	7	7	31.6	+++	0	0.0	-
	Total	49	49	28.6		15	7.7	66.7

1): Refer to Table 84.

得られ、これに混って僅か1粒の発芽種子が得られた。その大きさは $2x \times 2x$ と同じであった。生育した個体の形態的な特徴は全く $2x$ の親と同じで、花粉母細胞の染色体数からも $2x$ であることが確認された。このことから、この種子は自殖に由来したものであると思われる。

$4x \times 2x$ から得られた種子は両親のものに較べて約 $1/4$ の大きさであった (図25)。得ら

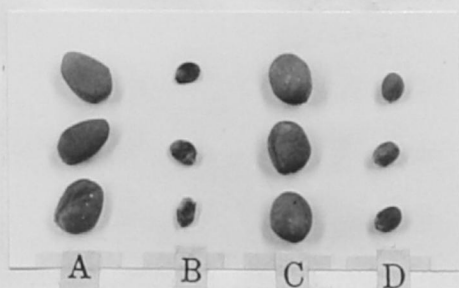


Fig. 25. Seeds produced by artificial pollination

- A: normal seeds from the cross, $2x \times 2x$.
- B: hybrid seeds from the cross, $2x \times 4x$, extremely shrivelled.
- C: normal seeds from the cross, $4x \times 4x$.
- D: viable hybrid seeds from the cross, $4x \times 2x$.

れた種子は皆発芽

し、これから3倍

体雑種が得られた。

莢の長さは、 $2x \times 2x$

が最も長く、 $4x \times 2x$

が最も短かった。

胚の発達割合の比

較

胚の発達を交配後3日目から21日目までの間にわたって調べた。この研究に用いた胚珠

種子の大きさは対照区の $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ に較べて約 $1/4$ であつた。組織学的な観察結果からこの種子は雑種胚の大きさによることが明らかになつた。種子発生の過程において、胚乳の嚢形成が対照のそれより早く起る以外は、特別の異常胚にも胚乳にもみられなかつた。

逆交雑の $2x \times 4x$ にあつては、胚の発達は交配後は日毎または他の交雑した個体の胚の発達と同じようであつたが、これ以後になつて発達は完全に止まつてしまつた。胚乳の異常は交配後9日目から起るということが分かつた。この結果から $2x \times 4x$ における胚の発達の停止は胚乳の異常発達に起因してゐると考えられる。

$4x \times 2x$ の交雑では、胚乳の嚢形成は両親の交配 ($2x \times 2x$, $4x \times 4x$) よりも早く起るということが認められたが、Brassica の同じ $4x \times 2x$ の交雑に於いても同じ現象がみられてゐる (Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus の交雑胚の発達割合は、発達初期においては Brassica のそれと同じであ

ったが、それ以後では Raphanus の胚の方が Brassica よりもより発達を示した (Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus の胚乳の発達は Brassica のそれより全段階を通して速く、発達する胚乳の核を数えることは困難であった。

Avena strigosa ($2n=14$) と A. fatua ($2n=42$) の間の正交交雑の研究から、Kihara and Nishiyama (1932) は、雄の配偶子が雌のそれよりも高い染色体を持つていっているとすれば、過剰の刺激力 "stimulative strength" が受精した卵や極核の体細胞分裂を始動させる。その結果胚乳や胚の核分裂が異常な速度で起る。一方雄の配偶子が雌のそれよりも低い染色体数を持つ場合 (A. fatua x A. strigosa) には "stimulative strength" が少ないので、胚や胚乳の生育が抑えられると考えた。ここで行なった Raphanus の正交交雑では、胚の初期の発達については "stimulative strength" を支持する結果は得られなかった。しかしこの交雑において胚の発達には差がみられなかった。また胚の大きさは交配後15日目までは余り対

照₂ ($2x \times 2x$, $4x \times 4x$) と変わりらず、これ以後になつて生育に大きな変化がみられるので、これは配根子の直接的な刺激作用によると思われたい。

胚のうに挿した胚珠皮組織の異常増殖のために種子の胚発生の途中で崩壊が起る

"somatoplastic sterility" が Medicago (Brink and Cooper 1939), Lycopersicon pimpinellifolium の2倍体と同値4倍体の交雑 (Cooper and Brink 1945) や Frimula の種間雑種の胚発生 (Woodel 1960a, b) において報告されている。また Datura の或る交雑では、胚乳に腫瘍が出来るでそれか胚珠皮を埋め尽くしてしまつて、不稔種子になることが報告されている (Satina et al. 1950, Sansome et al. 1942)。そこで行なつた Raphanus sativus の4つの交配の研究では胚のうの内皮の異常増殖や胚乳の腫瘍化を起すものはみつからなかつた。

Lilium と Hyacinthus の胚発生で、胚乳の染色体切断が雑種にあつては頻繁に、自家稔性の交配にあつても時々出現して、稔性が低くなる

ことが報告されている (Brock 1954a, b, 1955)。

また Triticum の正逆交雑 (Wakakuwa 1937), Aegilops の正逆交雑 (Katayama 1933) と Hordeum jubatum ($2n=28$) x Secale cereale ($2n=14$) (Cooper and Brink 1944) の交雑等の胚乳で、胚乳の異常、染色体橋、高倍数性を持つ小粒の出現による不稔現象が報告されている。 Raphanus の正逆交雑の一ホ ($2x \times 4x$) においては、胚乳の異常、高倍数性と思われる核が、胚乳の崩壊と共に観察された。

Brassica においてみられた胚乳の空胞化に続き、続いて起こる著しい崩壊 (Nishiyama and Inomata 1966) は Raphanus のこの交雑不適合種子の発生学的研究ではみられなかった。胚の発達も Brassica の交雑胚よりも Raphanus のそれの方が良かったし、胚乳の空胞化に続いて起こる胚乳の異常もむしろ軽度のものであった。

子房の人工培養

Raphanus sativus L. の2倍体と同質4倍体の正逆交雑においては、通常 $2x \times 4x$ では種子が得られないが、 $4x \times 2x$ では小粒の充実した発芽

する種子が得られる (Inomata 1970)。この組織学的な点に胚乳生学的研究によると、 $2x \times 4x$ の種子形成が止まるのと、 $4x \times 2x$ において種子形成が進行する現象は、Brassica campestris の二倍体と同様4倍体の間の正逆交雑においてみられる現象と類似している (Nishiyama and Inomata 1966)。しかし Brassica の $4x \times 2x$ においては、Raphanus のように種子形成はなく、三倍体種子は出来な。

Brassica の $2x$ と $4x$ の正逆交雑における種子崩壊の研究に基づいて、交雑種子をつくる試みを行ない、子房の人工培養によって三倍体雑種を育成することができた (Inomata 1968)。この方法により Raphanus sativus の二倍体と4倍体の交雑から三倍体雑種種子の育成を試みた。 $2x \times 4x$ においては1粒の種子をカゼイン酸分解物 (300mg/l) を添加した区においてえたが、不発芽であった。逆交雑の $4x \times 2x$ では、 $2x \times 2x$ あるいは $4x \times 4x$ よりもよい種子形成がみられた。これは種子の大きさが $2x \times 2x$ あるいは $4x \times 4x$ のと

れより約 $\frac{1}{4}$ 小さい完熟種子が得られるので、人工培養による種子形成において、栄養的には3倍体種子の方が条件が良いと思われる。

$2x \times 4x$ では発芽する種子が得られなかったが、更に詳細な実験を行なうと発芽可能な交雑種子が得られるかもしれない。

IV 摘 要

十字花科作物の交雑不適合性を研究するため、(i) 2倍体と同量4倍体の間の正逆交雑における種子崩壊の現象と、Brassica
campestris と Raphanus sativus を用いて組織学的並びに胚発生学的に追求した。(ii) この種子崩壊の現象を調べた結果に基づいて、雑種個体を得る目的で胚培養、胚珠培養、更には子房の人工培養を試み、培養基組成の検討を行なった。(iii) この人工培養によつて得た雑種の結果、Brassica 属の種間交雑に応用し、雑種作成を試みた。(iv) さらに子

房の人工培養に関する基礎的研究を行なった。特に無機塩濃度、糖濃度、物理的要因、或いは子房の植之込み時期の違いによる種子形成差異について調べた。(V) また2倍体と4倍体の正逆交雑における交雑不適合性の遊離アミノ酸の消長を調べた。

実験に用いた材料は Brassica campestris L. ssp. chinensis (L.) Makino 3品種, B. campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Olsson 5品種, B. campestris L. ssp. rapifera (Metzg) Sinsk. 2品種, B. campestris L. ssp. oleifera (Metzg) Sinsk. 1品種, B. oleracea L. var. capitata DC. 4品種と Raphanus sativus L. の4品種であった。

Brassica campestris の2倍体と同質4倍体の間の交雑で胚発生過程を調べると、 $2x \times 4x$ では、胚乳の膜形成が押えられ、種々の種の異常をもたらす胚乳の空胞化が現われ、胚乳の崩壊がみられた。 $4x \times 2x$ では、胚乳の発達は悪かったが、膜形成はいずれの組み合わせよりも早かった。その後、胚乳の崩壊が起こった。

下。正逆交雑における胚の発達程度はいずれも球型期までで止まつた。

Raphanus sativus の 2 倍体と同質 4 倍体の間の交雑における胚発生の過程に関しては、 $2x \times 4x$ では、B. campestris の場合と同じように胚乳の膜形成は抑えられる、種々の枝の異常ともなうし、崩壊した。が、 $4x \times 2x$ では胚乳の発達は強く膜形成がいずれの組み合わせよりも早くみられた。しかし、胚乳も胚も順調に発達し、小粒の発育する種子が得られた。

Brassica campestris の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交雑における交雑不稔から、生育出来る種子を得る目的で胚珠の人工培養を試みた。この胚珠の発達途中における組織学的な観察と培養後 6 日目（交配後 15 日目）に行なつた。異常な胚や未分化の胚と、異常な胚柄が見出された。膜形成を起した、或いは未だ起してない胚乳も或る胚珠にみられたが、大抵の胚珠には胚乳はほとんど存在しなかつた。

B. campestris の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交

雑の不稔性を克服するため交配後4日目に植
 物体から切り取った子房の人工培養を試みた。
 その胚珠の発達途中における組織学的観察は
 培養後11日目（交配後15日目）に行なった。
 その結果、培養液に添加した成長調整物質（IAA,
 カイネチン, ジベレリン）は胚、胚乳や胚珠
 の発達と余り強い関係を示さなかった。しかし
 なから、栄養物として添加したイースト抽出
 物、トマトジュース、カゼイン酸分解物、コ
 コナットミルク等は、その添加されたもの
 により、胚、胚乳や胚珠の発達に差異がみら
 れた。胚の最も良い発達のものは、異質胚
 や交配組み合わせに関係なく、自然条件下にお
 けるよりも3日から4日早い発達を示した。
 発達の遅れている胚珠にあつては、胚・胚乳
 の異常が観察された。

B. campestris の2倍体と同質4倍体の間の交
 雑は不稔になるが、これは主に胚乳の発達の
 異常に依ると考えられたので、胚乳の崩壊に
 ともなつて胚の崩壊が起る以前に、胚珠が

ら胚を取り出し、胚の人工培養を試みて雑種個体と得た。培地には "embryo factor" として Lupinus luteus の未熟種子から抽出した抽出物を加えた。得られた雑種個体は正交交雑とも、葉の型、厚さ、表面など両親の中間の形態を示し、これらの雑種も類似していた。

また B. campestris の2倍体と同質4倍体の正交交雑から、雑種種子を得る目的で胚珠の人工培養をこころみた。植えこんだ培地は Nitsch に IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジュース, イースト抽出物等を添加したものであり、交配後9日目の胚珠を植えこんだ。生育可能な種子はどの培養基組成の区からも得られなかった。これは胚珠の発達初期に胚珠と胚珠柄から離すことによる悪影響によると思われる。

更に B. campestris の2倍体と同質4倍体の交雑不適合性の子房の人工培養をこころみた。基本培地は Nitsch 2, それに生長調整物質 (IAA, カイネチン, ジベレリン) と栄養物質 (

トマトジュース, イースト抽出物, カゼイン
 酸分解物, ココナットミルク) を種々の濃度
 で添加し, 交配後4日目の子房を植え込んだ。
 種子形成は生長調整物質には影響されなかつ
 たが, 栄養物質の影響がみられた。4x x 2x の
 組み合わせから雑種はイースト抽出物(1個
 体), カゼイン酸分解物とココナットを含ま
 ぬ(1個体)の培養基から, 2x x 4x の雑種は
 ココナットミルク単独添加培地(2個体)か
 ら得られた。交雑組み合わせによつて得られた
 雑種の培地組成が異なるので, 正逆交雑に
 よつて栄養要求性が異なると考えられた。得
 られた雑種は, 形態的に「どれも類似して」
 て, 両親の中間形質を示した。

B. campestris の2倍体と同質4倍体の交雑不
 和性の子房の人工培養では, 栄養物を添加
 したものに於いては種子形成に差異がみら
 れたので, 更にこの関係を調べるために, コ
 コナットミルク, カゼイン酸分解物とイース
 ト抽出物の三者を用いて, 各々2つずつの組

み合せの種々の濃度において、種子形成を検討した。カゼイン酸分解物とココナットミルクを組み合せた実験区では種子形成は良好であり、その実験区からは $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交雑種子が得られた。他の栄養物の組み合わせでは良好な種子形成はみられなかった。また $4x \times 2x$ で胎座に付着した胚のみ発達してゐるのみがみられた。

交雑不融合の子房の人工培養において、更に適した培地の検討を行なうべくカゼイン酸分解物とココナットミルクの濃度効果を調べた。カゼイン酸分解物は $0 \text{ mg/l} \sim 500 \text{ mg/l}$ が良く、ココナットミルクは $0 \sim 15\%$ が良かった。

B. campestris 群と B. oleracea 群の間の正逆交雑においても交雑不融合性の現象がみられる。これについて2倍体と4倍体の雑種を得るために行なつた子房の人工培養を用いた。B. campestris 群と母系に用いたものでは、交雑種子が得られ、これから雑種個体を育成する。

とかできた。さらに莢の中には "torpedo" 型から完全に発達したもののまで、種々の発達段階の胚が胚柄に付着しているのがみられた。これを培養して、生育させたところいずれも要領半数体 ($2n=19$) であった。これらの組み合わせから得られた植物個体のうち生育したものは全部で 19 個体であった。逆交雑の B. oleracea 群と母系にしたものでは、胚の発達は胚珠の発達初期で停止してしまったような批が多数得られたが、雑種は 11 個の組み合わせから得られたかった。

Raphanus sativus L. の 2 倍体と同質 4 倍体の逆交雑の子房の人工培養に関しては、 $4x \times 2x$ では $2x$ および $4x$ の自殖したものよりも良い種子形成がみられた。これは $4x \times 2x$ の種子は対照の種子の約 $\frac{1}{4}$ の大きさで完熟するためと思われた。 $2x \times 4x$ ではカゼイニ酸分解物を含有培地において 1 粒種子が得られただけで発芽であった。

更に子房の人工培養における生理学的な研

究を行なつた。用いた材料は今まで用いたものと同じ *B. campestris* の 2 倍体と同量 4 倍体で、White, Nitsch, Heller と Murashige and Skoog の無機塩を基培地として、White と Morel の有機物、これに両者を合わせたものを添加した実験区を設け、種子形成を調べた。一般的に言えることは、*B. campestris* の子房の人工培養では、無機塩の濃度のうち White や Nitsch の培地が良く、有機物を添加しないものでも種子形成がみられ、添加物の種類が多くなると、種子形成率は低くなる傾向を示した。

培地に添加した糖濃度の種子形成に及ぼす効果に関しては、 $2x \times 2x$ では 3% のとき、 $4x \times 4x$ では 5% のときが最も良かった。

光の条件については 300-500 ルクスの方が最も良く、暗黒状態やより明るい条件下では種子形成率は低下した。

植之込み時期による種子稔性の変化を知るために、交配後日を追って 1 日目から 10 日目までの子房を植之込んだ。 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$

では種子の発芽が速いにつれて、種子活性が順次上昇した。

B. campestris の2倍体と同量4倍体の正逆交雑の交雑不適合性における遊離アミノ酸の消長を調べた。その結果、種子の崩壊が進行するとメチオニンとバアリン、とロイシンの増加がみられ、その増加は $2x \times 4x$ $4x \times 2x$ のいずれの組み合わせにおいても同様の傾向を示した。

謝 辞

この研究の計画と遂行は京都大学名誉教授西山市三博士の指導のもとで始め、京都大学教授常脇恒一郎博士の指導も受けた。また、同博士には本論文の原稿について助言と校閲を頂いた。ここに謝意を表する。

この研究を行なうに当り京都大学農学部実験遺伝学研究室のオノと、大阪府立大学教授中尾佐助博士をはじめとする遺伝育種学研究室のオノの援助と協力を得たので感謝する。

引用文献

- Beamish, K. I., 1955 Seed failure following hybridization between the hexaploid Solanum demissum and four diploid Solanum species. *Am. J. Botan.* 42: 297-304.
- Blakely, L. M., and F. C. Steward, 1961 Growth induction in cultures of Haplopappus gracilis. I. The behaviour of the cultured cells. *Am. J. Botan.* 48: 351-358.
- Blakeslee, A. F., and S. Satina, 1944 New hybrids from incompatible crosses in Datura through culture of excised embryos on malt media. *Science* 99: 331-334.
- Boyes, J. W., and W. P. Thompson, 1937 The development of endosperm and embryo in reciprocal interspecific crosses in cereals. *J. Genet.* 34: 203-227.
- Brink, R. A., and D. C. Cooper, 1939 Somatoplastic sterility in Medicago sativus. *Science* 90: 545-546.
- Brink, R. A., and D. C. Cooper, 1947 The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13: 423-477.
- Brink, R. A., D. C. Cooper, and L. E. Ausherman, 1944 A hybrid between Hordeum jubatum and Secale cereale. *J. Heredity* 35: 67-75.
- Brock, R. D., 1954a Fertility in Lilium hybrids. *Heredity* 8: 409-420.
- Brock, R. D., 1954b Spontaneous chromosome breakage in Lilium endosperm. *Ann. Botan.* 18: 7-14.
- Brock, R. D., 1955 Chromosome balance and endosperm failure in hyacinths. *Heredity* 9: 199-222.
- Caplin, S. M., and F. C. Steward, 1948 Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108: 655-657.
- Chopra, R. N., and P. S. Sabharwal, 1963 In vitro culture of ovules of Gynandropsis gynandra (L.) Briq. and Impatiens balsamina L. *Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Int. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi* pp. 257-264.
- Consden, R., A. H. Gardon, and A. J. P. Martin, 1944 Qualitative analysis of proteins: A partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.* 38: 224-232.

- Cooper, D. C., 1951 Caryopsis development following matings between diploid and tetraploid strains of Zea mays. Am. J. Botan. 38: 702-708.
- Cooper, D. C., and R. A. Brink, 1940 Somatoplastic sterility as a cause of seed failure after interspecific hybridization. Genetics 25: 594-617.
- Cooper, D. C., and R. A. Brink, 1944 Collapse of seed following the mating of Hordeum jubatum x Secale cereale. Genetics 29: 370-390.
- Cooper, D. C., and R. A. Brink, 1945 Seed collapse following mating between diploid and tetraploid races of Lycopersicon pimpinellifolium. Genetics 30: 376-401.
- Das, N. K., K. Patau, and F. Skoog, 1956 Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indole acetic acid in excised tobacco pith tissue. Physiol. Plant. 9: 640-651.
- Dulieu, H. L., 1966 Pollination of excised ovaries and culture of ovules of Nicotiana tabacum L. Phytomorphol. 16: 69-75.
- Duvick, D. N., 1952 Free amino acids in the developing endosperm of maize. Amer. J. Bot. 39: 656-661.
- Fukasawa, H., 1954 On the free amino acids in anthers of male-sterile wheat and maize. Japan J. Genetics 29: 135-137.
- Gautheret, R. J., 1950 Remarques sur les besoins nutritifs des cultures de tissus de Salix caprea. C. R. Soc. Biol. 144: 173-174.
- Gautheret, R. J., 1959 La culture des tissus végétaux. Masson Cie, Paris. pp. 863.
- Greulach, V. A., and J. G. Haesloop, 1958 The influence of gibberellic acid on cell division and cell elongation in Phaseolus vulgaris. Am. J. Botan. 45: 566-570.
- Guha, S., and B. M. Johri, 1966 In vitro development of ovary and ovule of Allium cepa L. Phytomorphol. 16: 353-364.
- Håkansson, A., 1953 Endosperm formation after 2x, 4x crosses in certain cereals, especially in Hordeum vulgare. Hereditas 39: 57-64.
- Håkansson, A., 1956 Seed development of Brassica oleracea and B. rapa after certain reciprocal pollinations. Hereditas 42: 373-396.

- Håkansson, A., and S. Ellerström, 1950 Seed development after reciprocal crosses between diploid and tetraploid rye. *Hereditas* 36: 256-296.
- Heller, R., 1953 Recherches sur la nutrition minérales des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.* 14: 1-223.
- Hoffmann, W., and R. Peters, 1958 Versuche zur Herstellung synthetischer und semi synthetischer Rapsformen. *Züchter* 28: 40-51.
- Hosoda, T., 1961 Studies on the breeding of new types of Napus crops by means of artificial synthesis in genomes of genus Brassica. *Bull. of Fac. of Agric. Tokyo Kyoiku Univ.* 7: 1-94. (in Japanese with English summary).
- Howard, H. W., 1939 The size of seeds in diploid and autotetraploid Brassica oleracea L. *J. Genet.* 38: 325-340.
- Inomata, N., 1967 Production of triploid hybrids of Brassica by embryo culture. *Japan J. Breeding* 17: 266-269.
- Inomata, N., 1968 In vitro culture of ovaries of Brassica hybrids between 2x and 4x. I. Cultured medium. *Japan J. Breeding* 18: 139-148.
- Inomata, N., 1970 Development of endosperm and embryo in reciprocal crosses between 2x and 4x in Raphanus sativus. *Japan J. Genetics* 45: 173-182.
- Jaranowski, J., 1962a Development of embryos and seeds of certain species and species crosses in Melilotus. *Genetica Polonica* 3: 45-59.
- Jaranowski, J., 1962b Fertilization and embryo development in the genus Lupinus. *Genetica Polonica* 3: 204-246.
- Jaranowski, J., 1962c Fertilization and embryo development in the genus Lupinus Tourn. Part II. Fertilization and embryo development following reciprocal, species hybridization. *Genetica Polonica* 3: 333-368.
- Jaranowski, J., and B. Wojciechowska, 1963 Cytological studies in the genus Lotus. Part II. Embryology of interspecific cross L. corniculatus x L. tenuifolius. *Genetica Polonica* 4: 277-292.

- Johri, B., and C. B. Sehgal, 1963 Growth of ovaries of Anethum graveolens L. Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Int. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi. pp. 245-256.
- Kameya, T., K. Hinata, and U. Mizushima, 1966 Fertilization in vitro of excised ovules treated with calcium chloride in Brassica oleracea L. Proc. Japan Acad. 42: 165-167.
- Kaneko, K., 1957 Studies of the embryo culture on the interspecific hybridization of Chrysanthemum. Japan J. Genetics 32: 300-305. (in Japanese with English summary).
- Kanta, K., and P. Maheshwari, 1963a Intraovarian pollination in some Papaveraceae. Phytomorphol. 13: 215-229.
- Kanta, K., and P. Maheshwari, 1963b Test-tube fertilization in some angiosperms. Phytomorphol. 13: 230-237.
- Karpechenko, G. D., 1922 The number of chromosomes and the genetic correlation of cultivated Cruciferae. Bull. Appl. Bot. and pl. Breed. 13: 1-14.
- Katayama, Y., 1933 Crossing experiments in certain cereales, with special reference to different compatibility between the reciprocal crosses. Mem. Coll. Agric., Kyoto Imp. Univ. 27: 1-75.
- Kihara, H., and I. Nishiyama, 1932 Different compatibility in reciprocal crosses of Avena, with special reference to tetraploid hybrids between hexaploid and diploid species. Japan J. Botany 6: 245-305.
- Koch, H., und R. Peters, 1953 Neu Gesichtspunkte der Rapszüchtung. Wiss. Z. Martin Luther Univ. 2: 363-367.
- Konzak, C. F., L. F. Randolph, and N. F. Jensen, 1951 Embryo culture of barley species hybrids. Cytological studies of Hordeum sativum x Hordeum bulbosum. J. Heredity 42: 124-134.
- La Croix, L. J., J. Naylor, and E. N. Larter, 1962 Factors controlling embryo growth and development in barley (Hordeum vulgare L.). Cand. Jour. Bot. 40: 1515-1523.
- Laibach, F., 1925 Das Taubwerden der Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. Zeitschr. f. Bot. 17: 417-459.

- Laibach, F., 1929 Ectogenesis in plants: methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *J. Heredity* 20: 201-208.
- Ledingham, G. F., 1940 Cytological and developmental studies of hybrids between Medicago sativus and a diploid from of M. falcata. *Genetics* 25: 1-15.
- Lee, J. H., and D. C. Cooper, 1958 Seed development following hybridization between diploid Solanum species from Mexico, Central and South America. *Am. J. Botan.* 45: 104-110.
- Linsmaier, E. M., and F. Skoog, 1965 Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Maheshwari, N., 1958 In vitro culture of excised ovules of Papaver somniferum. *Science* 127: 342.
- Maheshwari, N., and M. Lal, 1961 In vitro culture of excised ovules of Papaver somniferum. *Phytomorphol.* 11: 307-314.
- Matsubara, S., 1962 Studies on a growth promoting substance, "embryo factor", necessary for the culture of young embryos of Datura tatula in vitro. *Bot. Mag. (Tokyo)* 75: 10-18.
- Matsubara, S., 1964 Effect of Lupinus growth factor on the in vitro growth of various plants and carrot root tissue. *Bot. Mag. (Tokyo)* 77: 403-411.
- McLean, S. W., 1945 New hybrids with the aberrant species Datura ceratocaula, secured by embryo dissection. *Genetics* 30: 14-15.
- McLean, S. W., 1946 Interspecific crosses involving Datura ceratocaula obtained by embryo dissection. *Am. J. Botan.* 33: 630-638.
- Mizushima, U., 1950 On several artificial allopolyploids obtained in the tribe Brassica of Cruciferae. *Tohoku J. Agric. Res.* 1: 15-27.
- 水島亨三郎, 1952 アブラナ類の核遺伝学的研究. Brassica (アブラナ類)の種属間交雑とその倍數誘導体の核遺伝学的研究. 技報堂 pp. 112.
- Monnier, M., 1968 Comparaison du développement des embryons immatures de Capsella Bursa-pastoris, in vitro et in situ. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 115: 15-29.

- Morel, G., 1948 Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Ann. Epiphyt. N. S. 14: 123-234.
- Morinaga, T., 1929 The cytology of F_1 hybrids of B. napella and various other species with ten chromosomes. Cytologia 1: 16-27.
- Morinaga, T., and E. Fukushima, 1930 Another new chromosome number in Brassica. Bot. Mag. (Tokyo) 44: 373-374.
- Morinaga, T., 1934 Interspecific hybridization in Brassica. VI. The cytology of F_1 hybrids of B. juncea and B. nigra. Cytologia 6: 62-67.
- Moue, T., and K. Murakami, 1965 Studies on interspecific hybridization between Brassica pekinensis Rupr. and B. oleracea var capitata L. I. Morphological observation of seed sterility in the reciprocal crosses. Japan J. Breeding 15: 209.
- Müntzing, A., 1930 Über Chromosomenvermehrung in Galeopsis Kreuzungen und ihre phylogenetisch Bedeutung. Hereditas 14: 153-172.
- Müntzing, A., 1933 Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy. Hereditas 18: 33-55.
- Murashige, T., and F. Skoog, 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nagai, K., and T. Sasaoka, 1930 The number of chromosomes in the cultivated Brassica. Japan J. Genetics 5: 151-158.
- Nakajima, T., 1962 Physiological studies of seed development, especially embryonic growth and endosperm development. Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B 13: 13-48.
- 中島哲夫, 1970 胚珠培養と育種. 育種学 最近の進歩 第11集. 学術書出版会, pp. 53-59.
- Nakajima, T., and H. Morishima, 1958 Studies on embryo culture in plants. II. Embryo culture interspecific hybrids in Oryza. Japan J. Breeding 8: 37-42. (in Japanese with English summary).
- 中島哲夫, 松本弘, 1969 ペツニアのはい胚培養における胚座の役割. 園芸学会秋季大会研究発表要旨. 266-267.

- Nakajima, T., Y. Doyama, and H. Matsumoto, 1969 In vitro culture of excised ovules of white clover, Trifolium repens L. Japan J. Breeding 19: 373-378.
- 中尾佐助, 水本陽子, 1969 Petunia の胚珠培養に關する基礎研究. 近畿作物育種談話會報 14: 9-16.
- 日本化学会編, 1957 実験化学講座 23. 丸善. pp. 602.
- Nishi, S., J. Kawata, and M. Toda, 1959 On the breeding of interspecific hybrids between two genomes, "c" and "a" of Brassica through the application of embryo culture techniques. Japan J. Breeding 8: 215-222. (in Japanese with English summary).
- Nishi, S., J. Kawata, and M. Toda, 1962 Studies on the embryo culture in vegetable crops. II. Breeding of interspecific hybrids between cabbage varieties and chinese cabbage varieties through the application of embryo culture techniques. Bull. Hort. Res. Stat. Hiratsuka Japan A. No. 1: 111-156. (in Japanese with English summary).
- Nishikawa, K., 1959 Studies on abnormal seed development following incompatible crosses, I. Abnormal development of the endosperm and activity of growth substance in Aegilops squarrosa x Triticum dicoccum. Seiken Zihō 10: 84-94. (in Japanese with English summary).
- Nishiyama, I., 1952a Polyploid-studies in the Brassicaceae, I. The seed development in reciprocal crosses between diploid and tetraploid Raphanus. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 3: 1-7.
- Nishiyama, I., 1952b Polyploid-studies in the Brassicaceae, II. Free crossing between $2x$ - and $4x$ - varieties in Raphanus sativus. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 3: 8-14.
- 西山市三編, 1961 新編細胞遺伝學研究法. 養賢堂 pp. 547.
- Nishiyama, I., and Y. Inamori, 1952 Studies on artificial polyploid plants, XVII. On the occurrence of unexpected $4x$ -hybrids from the cross $2x$ x $4x$ in Brassica. Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 10: 99-106.

- Nishiyama, I., and Y. Inamori, 1953 Polyploid studies in the Brassicaceae, IV. Hybridization between diploid Brassica species ($2n=2C$) and their autotetraploids. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 5: 1-13.
- Nishiyama, I., and N. Inomata, 1966 Embryological studies on cross-incompatibility between $2x$ and $4x$ in Brassica. Japan J. Genetics 41: 27-42.
- Nitsch, J. P., 1951 Growth and development in vitro of excised ovaries. Am. J. Botan. 38: 566-577.
- Nitsch, J. P., 1954 Action du jus de tomate sur la croissance de certains tissus et organes végétaux. Bull. Soc. bot. Fr. 101: 433-440.
- Nitsch, J. P., 1963 The in vitro culture of flowers and fruits. Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Inst. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi. pp. 193-214.
- Norstog, K., 1961 The growth and differentiation of cultured barley embryos. Am. J. Botan. 48: 876-884.
- Olsson, G., 1954 Crosses within the campestris group of the genus Brassica. Hereditas 40: 398-418.
- Ranga Swamy, N. S., 1959 Morphogenetic response of Citrus ovules to growth adjvants in culture. Nature 183: 735-736.
- Rappaport, J., S. Satina, and A. F. Blakeslee, 1950 Extracts of ovarian tumours and their inhibition of embryo growth in Datura. Am. J. Botan. 37: 586-595.
- Rietsema, J., S. Satina, and A. F. Blakeslee, 1953 The effect of sucrose on the growth of Datura stramonium embryos in vitro. Am. J. Botan. 40: 538-545.
- Rudorf, W., 1950 Über der Erzeugung forschung und die Eigenschaften synthetischer Rapsformen. Z. Pflanzenz. 29: 35-54.
- Sabaharwal, P. S., 1963 In vitro culture of ovules, nucelli and embryos of Citrus reticulata Blanco. var. Nagpuri. Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Inst. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi. pp. 265-274.
- Sachar, R. C., and M. Kapoor, 1959 In vitro culture of ovules of Zephyranthes. Phytomorphol. 9: 147-156.

- Sachet, M., 1948 Fertilization in six incompatible species crosses of Datura. Am. J. Botan. 35: 302-309.
- Sachs, R. M., and A. Lang, 1957 Effect of gibberellin on cell division in Hyoscyamus. Science 125: 1144-1145.
- Sachs, R. M., C. F. Brets, and A. Lang, 1959 Shoot histogenesis: the early effects of gibberellin upon stem elongation in two rosette plants. Am. J. Botan. 46: 376-384.
- Sansome, E. S., S. Satina, and A. F. Blakeslee, 1942 Disintegration of ovules in tetraploid-diploid and in incompatible species crosses in Datura. Bull. Torrey Bot. Club 69: 405-420.
- Sanders, M. E., 1948 Embryo development in four Datura species following self and hybrid pollinations. Am. J. Botan. 35: 525-532.
- Sanders, M. E., 1950 Development of self and hybrid embryos in artificial culture. Am. J. Botan. 37: 6-15.
- Sanders, M. E., and P. R. Burkholder, 1948 Influence of amino acids on growth of Datura embryos in culture. Proc. Nat. Acad. Sci. 34: 516-526.
- Sarashina, M., 1964 Studies on the breeding of artificially synthesized rape (Brassica napus). I. F_1 hybrids between B. campestris group and B. oleracea group and the derived F_2 plants. Japan J. Breeding 14: 226-237. (in Japanese with English summary).
- Satina, S., and A. F. Blakeslee, 1935 Fertilization in the incompatible cross Datura stramonium x D. mentel. Bull. Torrey Bot. Club 62: 301-312.
- Satina, S., J. Rappaport, and A. F. Blakeslee, 1950 Ovular tumours connected with incompatible crosses in Datura. Am. J. Botan. 37: 576-586.
- Schroeder, C. R., and D. Spector, 1957 Effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. Science 126: 701-702.
- Shantz, E. M., and F. C. Steward, 1959 Investigation on growth and metabolism of plant cells, VII. Sources of nitrogen for tissue cultures under optimal conditions for their growth. Ann. Bot. N. S. 23: 371-390.
- 柴田村治, 1957 γ -H-P-クロマトグラムによる実験. 芸文社版
pp. 149.

- Shimotomai, N., 1925 A karyological study of Brassica.
I. Bot. Mag. (Tokyo) 39: 121-127.
- Shivanna, K. R., 1965 In vitro fertilization and seed formation in Petunia violacea Lindl. Phytomorphol. 15: 183-185.
- Skirm, G. M., 1942 Embryo culturing as an aid to plant breeding. J. Heredity 33: 210-215.
- Skoog, F., and C. O. Miller, 1957 Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exptl. Biol. 11: 118-131.
- Smith, P. G., 1944 Embryo culture of a tomato species hybrid. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 44: 413-416.
- Solomon, B., 1950 Inhibiting effects of autoclaved malt preventing the in vitro growth of Datura embryos. Am. J. Botan. 37: 1-5.
- Spoerl, E., 1948 Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. Am. J. Botan. 35: 88-95.
- Stokes, G. W., 1955 Seed development and failure in horseradish. J. Heredity 46: 15-21.
- Straus, J., and C. D. LaRue, 1954 Maize endosperm tissue grown in vitro, I. Culture requirements. Am. J. Botan. 41: 687-694.
- Tabata, M., and F. Motoyoshi, 1965 Hereditary control of callus formation in maize endosperm cultured in vitro. Japan J. Genetics 40: 343-355.
- Thompson, W. P., 1930 Shrivelled endosperm in species crosses in wheat, its cytological causes and genetical effects. Genetics 15: 99-113.
- Torrey, J. G., and Y. Shigemura, 1957 Growth and controlled morphogenesis in pea root callus tissue grown in liquid media. Am. J. Botan. 44: 334-344.
- Tulecke, W., 1957 The pollen of Ginkgo biloba: in vitro culture and tissue formation. Am. J. Botan. 44: 602-608.
- U. N., 1935 Genom-analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization. Japan J. Bot. 7: 389-452.
- Van Overbeek, J., M. E. Conklin, and A. F. Blakeslee, 1941 Factors in coconut milk of very young Datura embryos. Science 94: 350-351.

- Van Overbeck, J., M. E. Conklin, and A. F. Blakeslee, 1942 Cultivation in vitro of small Datura embryos. Am. J. Bot. 29: 472-477.
- Varner, J. E., and G. Ram Chandra, 1964 Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. Nat. Acad. Sci. 52: 100-106.
- Vasil, I. K., 1957 Effect of kinetin and Gibberellic acid on excised anthers of Allium cepa. Science 129: 1294-1295.
- Wakakuwa, Sh., 1934 Embryological studies on the different seed-development in reciprocal interspecific crosses of wheat. Japan J. Botan. 7: 151-185.
- Wardlaw, C. W., 1955 Embryogenesis in plants. Methuen & Co. Ltd. London pp. 381.
- Watkins, A. E., 1932 Hybrid sterility and incompatibility. J. Genet. 25: 125-162.
- Weaver, J. B. Jr., 1957 Embryological studies following interspecific crosses in Gossypium. I. G. hirsutum x G. arboreum. Am. J. Botan. 44: 206-214.
- Weaver, J. B. Jr., 1958 Embryological studies following interspecific crosses in Gossypium. II. G. arboreum x G. hirsutum. Am. J. Botan. 45: 10-16.
- White, P. R., 1963 The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press. New York. pp. 228.
- Woodel, S. R. J., 1960a Studies in British primulas, VII. Development of normal seed and hybrid seed from reciprocal crosses between P. vulgaris Huds. and P. veris L. New Phytologist 59: 302-313.
- Woodel, S. R. J., 1960b Studies in British primulas, VIII. Development of seed from reciprocal crosses between P. veris and P. elator (L.) Hill. New Phytologist 59: 314-325.
- Ziebur, N. K., and R. A. Brink, 1951 The stimulative effect of Hordeum endosperms on the growth of immature plant embryos in vitro. Am. J. Botan. 38: 253-256.
- Zieber, N. K., R. A. Brink, L. H. Graf, and M. A. Starmann, 1950 The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature Hordeum embryo. Am. J. Botan. 37: 144-148.

Studies on Cross-incompatibility in the Family
Cruciferae from the Standpoint of
Developmental Genetics

By

Nobumichi INOMATA

Summary

In order to study cross-incompatibility in the family Cruciferae, the following experiments were undertaken. (i) Histological and embryological aspects of seed collapse in the reciprocal hybrids between diploid and autotetraploid of Brassica campestris and Raphanus sativus were studied. (ii) According to the results of the above experiment the artificial culture of hitherto non-viable embryos, ovules and ovaries was attempted, and the medium for successful culture was pursued. (iii) The knowledge obtained from artificial culture of reciprocal hybrids was applied in obtaining interspecific hybrids of the genus Brassica. (iv) Basic studies on the effects of various conditions at artificial culture of ovaries, such as mineral salt content, sucrose content, physical factors and planting stages were undertaken. (v) Transition of free amino acids at developmental stages of reciprocal hybrids which

were hitherto incompatible was studied.

The materials used in this experiment were eleven species of Brassica campestris L., four species of B. oleracea L. and four species of Raphanus sativus L.

The results obtained are summarized in the following:

(i) Embryological studies on cross-incompatibility between diploid and autotetraploid Brassica and Raphanus:

In the process of seed development in the crosses between diploid and autotetraploid B. campestris, cell wall formation in endosperm did not occur, and after abnormal vacuolization, many kinds of abnormalities of nuclei and collapse of endosperm were noticed in the cross, $2x \times 4x$. In the reciprocal cross, $4x \times 2x$, development of endosperm was poor and cell wall formation started earlier than in the parents. Afterwards collapse of endosperm occurred. Embryo reached to the globular stage in both cross combinations.

In the developmental process of ovules in the crosses between diploid and autotetraploid Raphanus sativus, cell wall formation was suppressed in the cross, $2x \times 4x$ like in the cross, $2x \times 4x$ of Brassica, and many kinds of abnormalities of endosperm nuclei were observed, and finally endosperm collapsed. In the cross, $4x \times 2x$, development of endosperm was poor and the cell wall formation took place earlier, but devel-

opment of both embryo and endosperm was almost normal, and as a result, small viable seeds were obtained.

(ii) Histological observation of ovule and ovary cultured at a certain developmental stage: To obtain viable seeds from incompatible crosses between $2x$ and $4x$ of Brassica, ovule culture was made and developing ovules were fixed six days after explantation (15 days after pollination). Histological observation revealed that abnormal and undifferentiated embryos and anomalous suspensors were formed. Endosperm did not exist in most ovules, though when it existed cell wall was formed in certain but not all ovules.

Ovary culture was made for obtaining the hybrid seeds from an incompatible cross combination, $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$. Explantation in test tube was made four days after pollination. Histological observation (11 days after explantation) of developing ovules showed that the addition of growth regulators, such as IAA, kinetin and gibberellin, did not influence the development of embryo, endosperm and seed coat, but that the addition of nutrients, such as yeast extract, tomato juice, casein hydrolysate and coconut milk, promoted their development. The developmental rate depended on the concentration of nutrient added. The embryos which developed earliest were three to seven days earlier

than those under natural condition in each cross combination. When development of the ovule was later than that found in natural condition, abnormalities of embryo and endosperm were observed.

(iii) Embryo, ovule and ovary culture: Ordinarily, viable seeds were not obtained in both reciprocal crosses between $2x$ and $4x$ Brassica. It was mainly due to the abnormal development of endosperm. To overcome this abnormality, embryo was taken out from the ovule before the collapse of embryos and embryo culture was made, from which hybrid plants were produced. The media used for the embryo culture was White's basal medium added with "embryo factor" of the extract of immature Lupinus seeds. The morphology of hybrid plants obtained from the reciprocal crosses was all intermediate between the parents ($2x$ and $4x$) in respect to leaf shape, leaf thickness and structure of leaf surface.

Furthermore, ovule culture was made to get viable hybrid seeds from the same cross combinations. The medium used in the experiment was Nitsch's (1951) solution added with IAA, kinetin, gibberellin, tomato juice and yeast extract. Explantation of ovules was nine days after pollination. No viable seeds were obtained. Removal of the placenta at an early developmental stage seems to be critically detrimental for

seed development.

Ovary culture was also made for the same purpose. The medium used was again Nitsch's solution enriched with growth regulating substances (IAA, kinetin and gibberellin) and nutrients (tomato juice, yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk). Explantation of ovary was made four days after pollination. Seed production was not affected by the growth regulating substances, but by nutrients. The seeds were obtained from the cross, $4x \times 2x$, from the media containing yeast extract (one seed) and casein hydrolysate plus coconut milk (one seed), and from the cross, $2x \times 4x$, from a medium containing coconut milk (two seeds). It seems to suggest that nutritional requirement of hybrid seeds was different in the reciprocal crosses between $2x$ and $4x$. Morphological characteristics of the hybrids were all intermediate of their parents ($2x$ and $4x$).

(iv) Revised medium of ovary culture: As the nutrients supplied to the medium promoted the seed production by ovary culture, the interaction among coconut milk, casein hydrolysate and yeast extract was further investigated. Seed production was better when both coconut milk and casein hydrolysate were added to the medium. With this medium, hybrid seeds were obtained from both

cross directions, $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$. In the cross, $4x \times 2x$, however, well developed embryos, which attached directly to the placenta without both endosperm and seed coat, were found. Further study indicated that proper concentration of casein hydrolysate is 500 mg/l (1000 mg/l at maximum) and that of coconut milk is 15 percent in volume (20% at maximum).

(v) Production of new type of *B. napus* by ovary culture: This ovary culture method was applied to the reciprocal crosses between *B. campestris* and *B. oleracea*, from which hybrid seeds are not produced ordinarily. The ovary culture was successful when *B. campestris* was used as female parents and relatively large number of hybrid plants were produced. In this case, too, it was frequently observed that embryos without endosperm and seed coat were attaching the placenta. These embryos were almost matured and reached the "torpedo" stage. They were cultured in test tube and in total 19 hybrid plants were produced. In the cross, *B. oleracea* x *B. campestris*, no hybrid seeds nor developed embryos were obtained. In this cross, development of ovules was stopped at early developmental stages.

(vi) Ovary culture of *Raphanus sativus*: Ovary culture was made, also, with the reciprocal crosses between diploid and autotetraploid *Raphanus sativus*. Seed

production was better in $4x \times 2x$ than in $2x \times 2x$ and $4x \times 4x$. The hybrid seed of $4x \times 2x$ was one fourth in size of those of $2x \times 2x$ and $4x \times 4x$. In the cross, $2x \times 4x$, one seed was obtained in the medium containing casein hydrolysate, but it did not germinate.

(vii) Physiological studies of ovary culture: Several other physiological conditions for ovary culture were tested using diploid and autotetraploid B. campestris. First, the basal media of White (1963), Nitsch (1951), Heller (1953) and Murashige and Skoog (1962) supplied with organic salts of White and Morel (1948) were compared as to seed formation. Generally speaking, seed production of Brassica was better in lower (White's and Nitsch's) than in higher concentrations of mineral (Murashige and Skoog's). Organic constituents were not necessary for seed production, and their high concentrations lowered the rate of seed formation. As to sucrose concentration for ovary culture, the best seed setting was obtained, which was three percent in $2x \times 2x$ and five percent in $4x \times 4x$. The best light condition was 300 to 500 luxes. In order to know the best time for ovary culture, ovaries were cultured at various stages, namely one to ten days after pollination. In the cross of $2x \times 2x$ and $4x \times 4x$, seed set was increased when the time of explantation became late.

(viii) Changes of free amino acids contents in incompatible cross-combinations between diploid and autotetraploid Brassica: Furthermore, change of free amino acid contents in cross-incompatible hybrids between $2x$ and $4x$ Brassica was compared with that in their parents. It was found that methionine and valine, and leucine increased in the former according to progress of degeneration of ovules. No difference was found between $2x$ x $4x$ and $4x$ x $2x$.

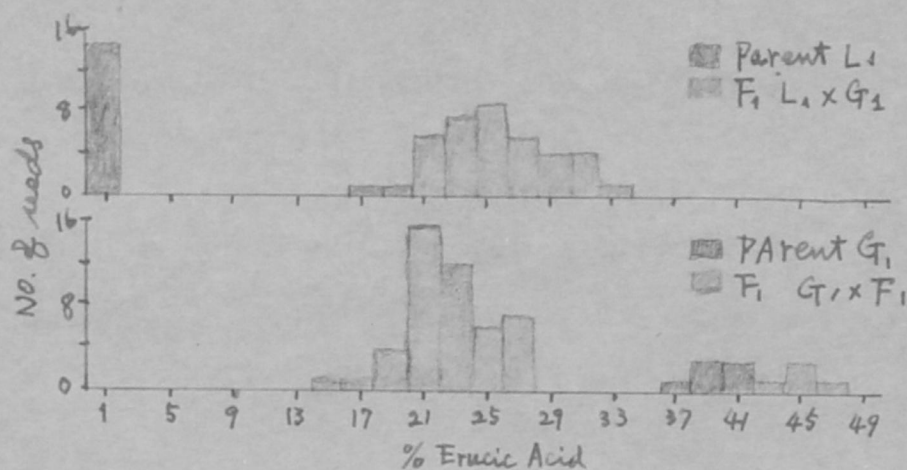


Fig. 1.

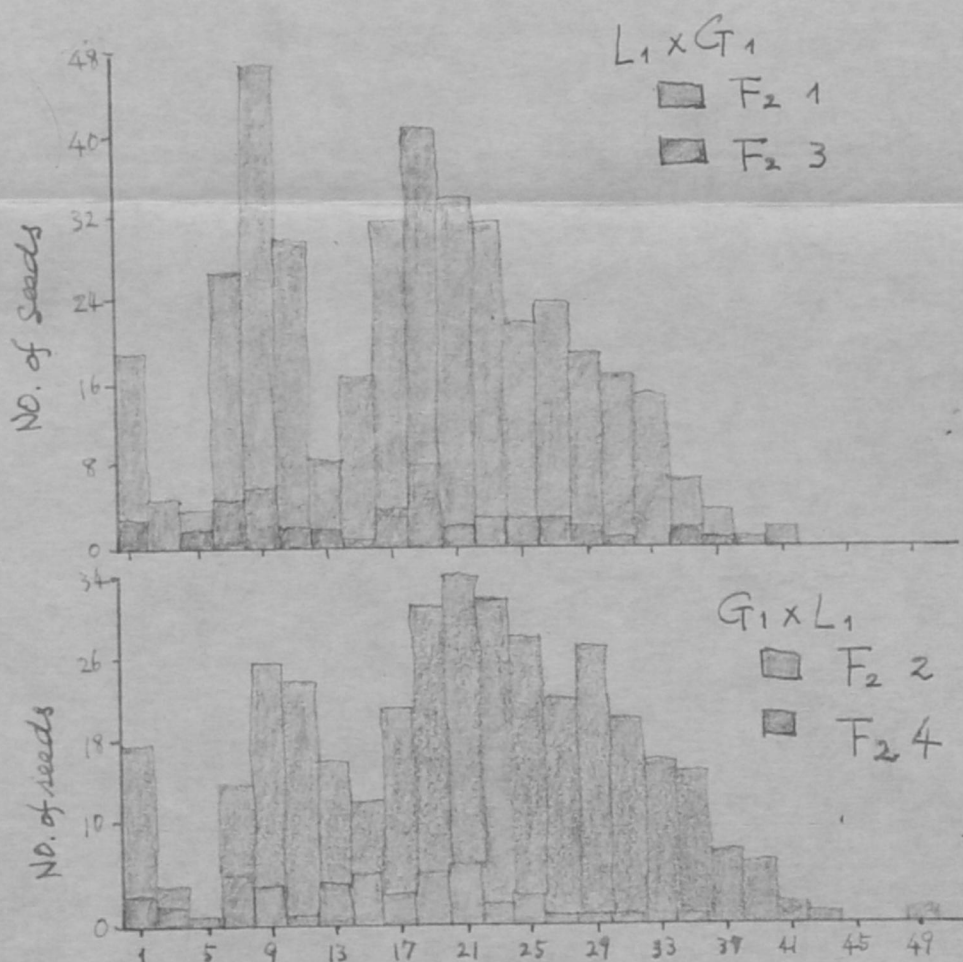


Fig. 2.